



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

LAUANA GREICY TONON LEMOS

“Investigação da atividade antitumoral do composto sintético LQB-223 em linhagens de câncer de mama”

**Orientador (es): Prof. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia
Prof. Dra. Gabriela Nestal de Moraes**

**RIO DE JANEIRO
2018**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

LAUANA GREICY TONON LEMOS

“Investigação da atividade antitumoral do composto sintético LQB-223 em linhagens de câncer de mama”

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer
como parte dos requisitos para obtenção do título
Doutor em Oncologia

**Orientador (es): Prof. Dra. Raquel Ciivalschi Maia
Prof. Dra. Gabriela Nestal de Moraes**

**RIO DE JANEIRO
2018**

L555i Lemos, Lauana Greicy Tonon

Investigação da atividade antitumoral do composto sintético LQB-223 em linhagens de câncer de mama / Lauana Greicy Tonon Lemos. – Rio de Janeiro, 2018.

132 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018.

Orientadores: Raquel Ciuvalschi Maia; Gabriela Nestal de Moraes.

1. Neoplasias da Mama. 2. Resistência a Medicamentos Antineoplásicos. 3. Toxicidade. 4. Composto LBQ-223. I. Maia, Raquel Ciuvalschi (orient.). II. Moraes, Gabriela Nestal de (orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99449



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

LAUANA GREICY TONON LEMOS

“Investigação da atividade antitumoral do composto sintético LQB-223 em linhagens de câncer de mama”

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia
Prof. Dra. Gabriela Nestal de Moraes**

Aprovada em: 21/11/2018

EXAMINADORES:

Dr. José Andrés Morgado Diaz (INCA)
Dr^a. Sheila Coelho Soares Lima (INCA)
Dr^a. Thereza Christina Barja Fidalgo (UFRJ)
Dr^a. Claudia dos Santos Mermelstein (UFRJ)

Dr. Julio Cesar Madureira de Freitas Junior (Suplente interno) (INCA)
Dr. André Luiz Mencialha (Suplente externo) (UERJ)

**RIO DE JANEIRO
2018**

*Àqueles que são a minha
fonte de inspiração e fortaleza:
Pai e Mãe*

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, que com muito amor, incentivo e compreensão, não mediram esforços para que eu pudesse ter a melhor educação e coragem para enfrentar a “vida lá fora”. Mesmo sendo filha única, não me guardaram debaixo de suas asas, mas me deram asas fortes para enfrentar meus próprios caminhos. Eu amo vocês!

À minha orientadora, Dra. Raquel, que há cinco anos me abriu as portas do laboratório, da resistência e do conhecimento. Obrigada por confiar no meu trabalho, nas minhas ideias e por batalhar para que o nosso grupo tenha sempre o seu lugar ao sol. Por todo o suporte científico e também pelas palavras de força e incentivo mesmo nos momentos de crise que vem enfrentando a ciência do nosso país. Você é um grande exemplo de força e determinação para todos nós! Muito obrigada!

À minha co-orientadora e conselheira, Gabi, que “importantemente” contribuiu para todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho. Ensinou-me a colocar a mão na massa nas técnicas que eu nunca tinha trabalhado e teve bastante paciência. Conduziu as discussões científicas de forma que eu pude amadurecer e me apaixonar pela biologia molecular. Além de todas as nossas conversas amigas e incentivadoras, sempre pude contar com seu apoio científico e puxões de orelha, que foram imprescindíveis para meu crescimento. É um grande exemplo de determinação, ética, luta e incansável dedicação à ciência. Muito obrigada pela confiança e por me mostrar o quão apaixonante é a biologia molecular. Serei sempre grata e tenho o coração repleto de carinho, amor e admiração!

Ao grupo mama: À Lu, por todo apoio, suporte científico e prático. Conviver com você me ensina muitas coisas, e uma delas é a lidar com mais leveza com as questões do trabalho. À Bruna que, com tão pouco tempo, fez-se imprescindível em nosso grupo e, particularmente, eu tive a sorte de compartilhar momentos de incentivo, conversas e risadas. Obrigada por dar um “up” ao meu trabalho e por ser essa luz tão incansável e guerreira! À Debs, que embora longe fisicamente, será sempre “grupo mama”. Obrigada por me ensinar a resiliência, a leveza de ver as coisas da vida e que o amor supera todos os nossos preconceitos! Que suas pernas “moles” te levem ao infinito!

À Thaís, tão nova e tão dedicada. Obrigada pela companhia, por ser minha ouvinte e conselheira. E por tantas risadas que trazem alegria ao nosso grupo. À Marcela, carinhosamente chamada de Surya, é a pessoa mais doce desse

laboratório. É justa e dedicada e tem sido o nosso guru do PCR. À Frava, grande amiga e parceira, mas que infelizmente não me dá aulas de citometria para nunca deixar de ter a oportunidade de trabalhar comigo. Obrigada pelo carinho, pelos ensinamentos técnicos e de vida. Ao Gabriel, o nêni, o garoto prodígio que trouxe luz e novos caminhos ao meu trabalho. Gabriel é aquela alma jovem que veio para quebrar vários paradigmas. Muito obrigada por me ensinar tanta coisa!

Aos meus amigos queridos de trabalho: Paula, Fernanda, Duni Michelle, Gustavo, Tandressa, Mamede, Lucas, Mari, Nicolas, Paloma, Luciano, Marcos, Robs, Rebs, Cris, Claudete, Marcos e Paty por tornarem a convivência tão agradável, afetuosa e acolhedora. Em especial ao Caíque que não mediu esforços para me auxiliar nos experimentos nessa reta final, amenizando toda a minha ansiedade diante dos prazos. E à Gis, que sempre se mostrou disposta a discutir e aprimorar com ideias inovadoras a nossa rotina de trabalho. Ainda tem participação especial em meu trabalho e em meu coração, uma fonte de inspiração para mim. Muito obrigada a todos! Sinto-me em casa quando estou com vocês. E vocês não imaginam o quanto isso é importante!

Ao meu Momi, meu amor, meu suporte, aquele que aguenta todas as minhas barras. Quem me acorda e faz o meu café, meu porto-seguro, quem me faz rir e chorar de emoção. Quem escuta as minhas lamentações quando o *Western blotting* não funciona, e mesmo sem saber o que isso significa, tem sempre algo de otimista para dizer. Obrigada pelo apoio, pelas conversas, por me questionar. Você é o substrato da minha Pgp, o *splicing* alternativo das minhas certezas, a minha direção 5'--->3'. Te amo, te admiro e um dia quero ganhar tantos prêmios quanto você!

Ao meu gato Bowie, que esteve, literalmente, ao meu lado durante toda a confecção desse manuscrito. Fazia-me parar e respirar em momentos oportunos.

Às minhas amigas, irmãs de vida, Dessa, Su, Jami, Camis e Ciça, que são as provas-vivas de que o amor não tem distância. Muito obrigada!

Agradeço aos meus familiares, pois a certeza que tenho de que sempre encontrarei um terreno firme para retornar me dá segurança e me impulsiona para novos caminhos. Eu não poderia ter família melhor!

Às pessoas queridas que tive a felicidade de conhecer quando morei no alojamento durante alguns anos dessa jornada. Conheci gente do Brasil inteiro, culturas, sotaques e comidas novas. Em especial à Tallita, minha amiga linda e querida, que trouxe luz, sol, praia, alegria e uma amizade para a vida toda. Muito obrigada!

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, Rodrigo, Danielle e Andrea, por toda a ajuda durante a confecção deste manuscrito. Obrigada!

Aos tecnologistas da instituição, Karina Lani, Matheus Rajão e Priscila Valverde. Obrigada por todo o suporte!

Aos membros da banca examinadora por aceitarem avaliar e contribuir com este trabalho. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Prefiro queimar o mapa
Traçar de novo a estrada
Ver cores nas cinzas
E a vida reinventar”*

Francisco, El Hombre



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO COMPOSTO SINTÉTICO
LQB-223 EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA**

Lauana Greicy Tonon Lemos

RESUMO

Tumores de mama são heterogêneos e possuem diferentes evoluções clínicas. O tratamento do câncer de mama envolve diversas modalidades terapêuticas, sendo a quimioterapia composta pela doxorubicina (DOX) e o docetaxel (DTX). Um grande obstáculo para o sucesso terapêutico é a resistência a múltiplas drogas. Adicionalmente, este tratamento pode causar toxicidade para as pacientes. Por esse motivo, a identificação de novos compostos que sejam capazes de sobrepujar os mecanismos de resistência e que gerem menor toxicidade associada ao tratamento do câncer de mama é de extrema relevância. Dessa forma, o composto 11a-N-Tosil-5-deoxi-pterocarpano, LQB-223, foi sintetizado e vem sendo testado pelo nosso grupo em modelos *in vitro* quanto a sua atividade antineoplásica. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos antitumorais do LQB-223 em células de câncer de mama de diferentes subtipos. Para tal, as linhagens MCF-7 (neoplásica, não invasiva e subtipo luminal), MDA-MB-231 (neoplásica, invasiva e subtipo triplo-negativo) e HB4a (luminal, não neoplásica) foram utilizadas como modelo. A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelos ensaios de MTT e clonogênico. Para detecção de apoptose, foi feita a marcação de Anexina V/PI por citometria de fluxo. A migração e motilidade celular foram avaliadas pelos ensaios de *wound-healing* e fagocitose de ouro coloidal, respectivamente. A expressão das proteínas foi mensurada por *Western blotting*. Para análise da toxicidade nas culturas 3D, o volume e a migração em gelatina foram aferidos e a viabilidade verificada pelo ensaio da fosfatase ácida. Nossos resultados mostram que o tratamento com LQB-223 inibiu a viabilidade e a formação de colônias nas células MCF-7 e MDA-MB-231, bem como resultou em aumento do número de células marcadas com anexina V/PI e diminuição de procaspases, sugerindo morte celular por apoptose. Além disso, um acúmulo de células na fase G2/M, mediante o tratamento com o LQB-223 foi observado, independentemente da modulação da expressão de p53 e p21. A sensibilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231 ao LQB-223 foi associada à modulação na expressão do fator de transcrição oncogênico FOXM1 e das proteínas antiapoptóticas Survivina, XIAP, c-IAP1 e Mcl-1. De forma importante, o LQB-223 não reduziu a viabilidade de células não neoplásicas de mama, sugerindo um efeito preferencial deste composto para células tumorais. Diferentemente da exposição à DOX, o tratamento com LQB-223 resultou na redução da taxa migratória e motilidade celular de MCF-7 e MDA-MB-231. Em conformação 3D, o LQB-223 induziu a diminuição da viabilidade, volume e migração celular. Em conjunto, estes resultados revelam que o composto sintético LQB-223 promove efeitos citotóxicos em células neoplásicas de câncer de mama de diferentes subtipos tumorais em cultura 2D e 3D, além de modificar o seu perfil migratório. Ademais, o LQB-223 induz baixa toxicidade em células não neoplásicas de mama, apontando-o como um promissor composto de efeito preferencial para células tumorais de mama. Nossos dados *in vitro* encorajam a continuidade do estudo pré-clínico do LQB-223 para câncer de mama, no que tange à avaliação de seus efeitos antitumorais em modelos *in vivo*.

Palavras-chave: Neoplasias da Mama. Resistência a Medicamentos Antineoplásicos. Toxicidade. Composto LQB-223.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INVESTIGATION OF THE ANTITUMOR ACTIVITY OF LQB-223 SYNTHETIC
COMPOUND IN BREAST CANCER CELLS LINES.**

**Lauana Greicy Tonon Lemos
ABSTRACT**

Breast tumors are heterogeneous and present different clinical outcomes. Breast cancer treatment involves different strategies, among which chemotherapeutic protocols are based on the combination of doxorubicin (DOX) and docetaxel (DTX). A major obstacle for successful treatment of breast cancer is multidrug resistance. Also, breast cancer patients receiving chemotherapy present many side effects, mainly cardiac and haematological toxicity. Therefore, the prompt development of novel anticancer compounds that might be able to surpass drug resistance mechanisms in breast cancer is crucial. Thus, the compound 11a-N-Tosyl-5-deoxy-pterocarpan, LQB-223, was synthesized and has been tested *in vitro* in our group. The aim of this project was to investigate the antitumor effects of LQB-223 synthetic compound in human breast cancer cells. For this purpose, we used MCF-7 (non-invasive, neoplastic, luminal-type), MDA-MB-231 (invasive, neoplastic, triple-negative) and HB4a (originated from luminal breast cells, non-neoplastic) breast-derived cell lines. The cell viability was assessed by MTT and clonogenic assay. Annexin V/PI staining and cell cycle distribution was detected by flow cytometry. Cell migration and motility were assessed by *wound-healing* and phagokinetic track motility assay, respectively. Protein expression was analyzed by *Western Blotting* assay. LQB-223-mediated toxic effects in 3D conformation were evaluated by photographing and measuring spheroid size, as well as performing the acid phosphatase (APH) and gelatin migration assays. Our data show that LQB-223 compound inhibited cell viability and clonogenicity, promoted caspase-mediated apoptosis and procaspases decreased levels. Moreover, the LQB-223 treatment induced G2/M arrest in MCF-7 and MDA-MB-231, irrespective of p53 and p21 status. The LQB-223-mediated cytotoxic effects involved the modulation in the expression of FOXM1 oncogenic transcription factor and Survivin, XIAP, c-IAP1 and Mcl-1 anti-apoptotic proteins. Importantly, LQB-223 treatment was not cytotoxic to breast non-neoplastic cells, showing that the compound was preferential for tumor cell lines. Also, we found a reduction in migratory profile and cell motility of MCF-7 and MDA-MB-231 following treatment with LQB-223, but not DOX. In 3D conformation, LQB-223 treatment decreased cell viability, as well as reduced tumor size and cell migration. These results suggest the LQB-223 promotes cytotoxic effects and modulates the migratory profile in 2D and 3D models of breast cancer exhibiting different molecular phenotypes. Also, LQB-223 treatment presents little cytotoxicity towards non-neoplastic cells, suggesting it is a promising selective compound against breast cancer cells. Our data encourage the preclinical evaluation of LQB-223 antitumoral effects for breast cancer in the *in vivo* setting.

Keywords: Breast Cancer. Antineoplastic Resistance. Toxicity. LQB-223 compound.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Anacárdico
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
APAF1	Fator ativador de protease apoptótica 11
APH	Fosfatase ácida
APS	Persulfato de amônio
ATP	Adenosina -5'-trifosfato
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	Proteína X ligada à Bcl-2
Bcl-2	Linfoma de células B-2 (<i>B-cell lymphoma-2</i>)
BCRP	Proteína associada à Resistência no Câncer de Mama
BIR	<i>Baculoviral IAP repeat</i>
BRCA1	BReast Cancer Gene 1
BRCA2	BReast Cancer Gene 2
BRUCE/Apollon	Enzima conjugada à ubiquitina contendo BIR
BSA	Albumina sérica bovina
CARD	Domínio de ativação e recrutamento de caspases
CCNA	Complexo Relacionado à Ciclinas A
CCNE	Complexo Relacionado à Ciclinas A
CDK	Quinase Dependente de Ciclina
c-IAP1	Proteína 1 celular Inibidora da Apoptose
c-IAP2	Proteína 2 celular Inibidora da Apoptose
CTR	Controle
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DED	Domínio Efetor de Morte
DISC	Complexo indutor de sinalização de morte
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
DTX	Docetaxel
E2F1	Fator de Transcrição 1 de E2F
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
FADD	Domínio de morte associado a Fas
FasL	Ligante de Fas
FOX	<i>Forkhead box</i>
FOXM1	<i>Forkhead box M1</i>
HER-2	Receptor de fator de crescimento epidermal humano 2
IAP	Proteína inibidora da apoptose
IKK	I κ B quinase
ILP2	<i>IAP-like 2 protein</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
INCENP	Proteína Interna do Centrômero
ML-IAP	IAP de melanoma (<i>Melanoma IAP</i>)
MTT	3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2-5-difenil tetrazólio brometo
MRP1	Proteína 1 associada à Resistência às Múltiplas drogas
NAIP	Proteína inibidora da apoptose neuronal
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
PBS	Solução salina de fosfato

PgP	Glicoproteína P
PI	Iodeto de Propídeo
PUC-Rio	Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro
RB	Retinoblastoma
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RIP1	Receptor de Interação com a Proteína 1
RNase	Ribonuclease A
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SMAC/DIABLO	<i>Second mitochondrial-derived activator of caspases/ Direct IAP binding with low PI</i>
TEM	Transição Epitélio-Mesênquima
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TM	Domínio Transmembrana
TNRF-1	Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral- α
TNRF-2	Receptor 2 do Fator de Necrose Tumoral- α
TRADD	Domínio de Morte Associada ao TNFR
TBS	Solução salina de Tris
UBA	Domínio associado à ubiquitina
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
XIAP	IAP ligada ao cromossomo X (<i>X-linked IAP</i>)
WHO	World Health Organization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1: Estatística de incidência do câncer de mama no Brasil	1
Figura 1.2: Mecanismos envolvidos na resistência ao tratamento quimioterápico do câncer de mama	8
Figura 1.3: Desenho esquemático do ciclo celular	10
Figura 1.4: Vias intrínseca e extrínseca da apoptose	14
Figura 1.5: Membros da família das IAPs envolvidos com a regulação da apoptose	16
Figura 1.6: Membros da família Bcl-2	20
Figura 1.7: Desenho esquemático da transição epitélio-mesênquima (TEM)	24
Figura 1.8: Estrutura molecular do composto LQB-223	30
Figura 1.9: Quadro comparativo entre os modelos de cultura bi (2D) e tridimensional (3D)	32
Figura 1.10: Classificação das estruturas celulares 3D de acordo com a morfologia dos agregados	34
Figura 3.1: Desenho experimental utilizado para a avaliação da viabilidade e volume das culturas celulares em conformação 3D mediante o tratamento com LQB-223 ao longo dos dias	47
Figura 3.2: Atividade da Fosfatase ácida na formação de p-nitrofenol	48
Figura 4.1: Fluxograma ilustrando o desenho experimental do estudo	50
Figura 5.1: Alterações na viabilidade celular induzidas pelo composto LQB-223 nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231	53
Figura 5.2: Alterações no padrão de formação de colônias mediante o tratamento com LQB-223 nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231	54
Figura 5.3: Alterações morfológicas na linhagem MCF-7 após o tratamento com LQB-223	55
Figura 5.4: Alterações morfológicas na linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com LQB-223	56
Figura 5.5: Alterações na viabilidade celular e formação de colônias induzidas pelo LQB-223 na linhagem celular não neoplásica HB4a	58
Figura 5.6: Alterações morfológicas na linhagem HB4a após exposição ao LQB-223	59

Figura 5.7: Efeito do LQB-223 na distribuição de fases do ciclo celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231	62
Figura 5.8: Avaliação dos níveis protéicos de p53 e p21 após exposição das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 ao composto LQB-223	63
Figura 5.9: Alterações no perfil de marcação de anexina V/PI e expressão das procaspases -7 e -9 mediante o tratamento da linhagem celular MCF-7 com o composto LQB-223	65
Figura 5.10: Alterações no perfil de marcação de anexina V/PI e expressão das procaspases -3 e -7 mediante o tratamento da linhagem celular MDA-MB-231 com o composto LQB-223	66
Figura 5.11: Expressão de proteínas relacionadas à resistência às drogas nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 antes e após o tratamento com LQB-223	68
Figura 5.12: Avaliação do padrão de migração celular de células MCF-7 mediante o tratamento com LQB-223	70
Figura 5.13: Avaliação da taxa de migração celular das células MCF-7 mediante o tratamento com LQB-223	71
Figura 5.14: Avaliação do padrão de migração celular de células MDA-MB-231 mediante o tratamento com LQB-223	72
Figura 5.15: Avaliação da taxa de migração celular das células MDA-MB-231 mediante o tratamento com LQB-223	73
Figura 5.16: Análise da motilidade celular das linhagens MCF-7 após o tratamento com LQB-223	75
Figura 5.17: Análise da motilidade celular das linhagens MDA-MB-231 após o tratamento com LQB-223	76
Figura 5.18: Padronização de cultura tridimensional (3D) <i>in vitro</i> das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231	78
Figura 5.19: Alterações morfológicas em cultura 3D na linhagem celular MCF-7 após o tratamento com o composto LQB-223	79
Figura 5.20: Alterações morfológicas em cultura 3D na linhagem celular MDA-MB-231 após o tratamento com o composto LQB-223	80
Figura 5.21: Alterações da viabilidade celular induzidas pelo composto LQB-223 em culturas 3D das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231	81
Figura 5.22: Avaliação da taxa de migração celular em culturas 3D na linhagem MCF-7	83

Figura 5.23: Avaliação da taxa de migração celular em culturas 3D na linhagem MDA-MB-231	84
Figura 5.24: Quantificação da taxa de migração celular em culturas 3D das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após o tratamento com LQB-223	85
Figura 6.1: Mecanismos desencadeados pelo tratamento com o composto LQB-223 nas células MCF7 e MDA-MB-231	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Anticorpos primários utilizados na técnica <i>Western blotting</i>	43
---	----

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de mama	1
1.1.1	Caracterização e epidemiologia do câncer de mama	1
1.1.2	Tratamento do câncer de mama: Doxorrubicina e Docetaxel	4
1.2	Mecanismos de resistência aos quimioterápicos	5
1.2.1	Alterações no ciclo celular e nos pontos de checagem	9
1.2.2	Resistência à apoptose	12
1.2.2.1	Apoptose	12
1.2.2.2	Via intrínseca e extrínseca da apoptose	12
1.2.2.3	Regulação da apoptose pelas proteínas inibidoras da apoptose (IAPs)	15
1.2.2.4	Regulação da apoptose pelos membros da família Bcl-2	19
1.3	Interface entre a resistência às drogas e o processo de invasão e metástase	23
1.4	Interface entre as proteínas inibidoras da apoptose e o processo de migração e metástase	26
1.5	Novas estratégias para o tratamento <i>in vitro</i> de células tumorais de mama	28
1.5.1	Composto LQB-223	28
1.5.2	Desenvolvimento de modelos com culturas tridimensionais <i>in vitro</i>	31
1.6	Justificativa para o estudo	34
2	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo geral	36
2.2	Objetivos específicos	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Cultura de células	37
3.2	Agentes citotóxicos utilizados no tratamento das linhagens celulares ..	38
3.3	Análise das alterações morfológicas induzidas na morfologia celular após o tratamento com os compostos	38
3.4	Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de MTT	38
3.5	Ensaio de Formação de Colônias	39
3.6	Identificação da morte celular por marcação de Anexina V/PI	40

3.7	Análise da distribuição do ciclo celular por quantificação do conteúdo de DNA	41
3.8	Detecção da expressão de proteínas por <i>Western blotting</i>	41
3.9	Avaliação da migração celular pelo ensaio de <i>wound-healing</i>	43
3.10	Avaliação da proliferação com cristal violeta	44
3.11	Quantificação da motilidade celular pelo ensaio fagocinético de ouro coloidal	45
3.12	Formação de culturas celulares em conformação 3D	46
3.13	Avaliação do volume de culturas celulares em conformação 3D	47
3.14	Avaliação da viabilidade celular em cultura 3D através da dosagem da enzima fosfatase ácida (APH)	47
3.15	Avaliação da migração de culturas celulares em conformação 3D pelo método de migração em gelatina	49
3.16	Análise estatística	49
4	DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	O composto LQB-223 apresenta efeito citotóxico para as células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231	51
5.2	O composto LQB-223 induz toxicidade inferior aos quimioterápicos DOX e DTX na linhagem de mama não neoplásica HB4a	57
5.3	O composto LQB-223 altera o perfil do ciclo celular, causando um arresto em G2/M nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231	60
5.4	O tratamento com o composto LQB-223 induz morte celular mediada por caspases nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231	63
5.5	O tratamento com LQB-223 modula a expressão das proteínas FOXM1, Mcl-1, XIAP, Survivina e c-IAP1 nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231	67
5.6	A redução da taxa migratória das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 é observada após exposição ao composto LQB-223	68
5.7	O tratamento com LQB-223 reduz a motilidade celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231	73
5.8	O tratamento com LQB-223 diminui a viabilidade de células MCF-7 e MDA-MB-231 em conformação tridimensional	77
5.9	O tratamento com LQB-223 diminui a taxa migratória de células MCF-7 e MDA-MB-231 em conformação 3D	82


6 DISCUSSÃO	86
7 CONCLUSÕES	98
8 PERSPECTIVAS	99
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXOS	121
ANEXO I Trabalho científico publicado, não relacionado à tese de doutorado - Lemos, L.G.T., Victorino, V.J., Herrera, A.C.S.A., Aranome, A.M.F., Cecchini, A.L., Simão, A.N.C., Panis, C., and Cecchini, R. (2015). Trastuzumab-based chemotherapy modulates systemic redox homeostasis in women with HER2-positive breast cancer. <i>Int. Immunopharmacol.</i> 27, 8 14.....	121
ANEXO II Trabalho científico publicado, relacionado à tese de doutorado - Lemos, L.G.T., Nestal de Moraes, G., Delbue, D., Vasconcelos, F. da C., Bernardo, P.S., Lam, E.W.-F., Buarque, C.D., Costa, P.R., and Maia, R.C. (2016). 11a-N-Tosyl-5-deoxi-pterocarpan, LQB-223, a novel compound with potent antineoplastic activity toward breast cancer cells with different phenotypes. <i>J. Cancer Res. Clin. Oncol.</i> 142, 2119–2130	122

1. Introdução

1.1 Câncer de mama

1.1.1 Caracterização e epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete as mulheres no Brasil e no mundo. Segundo levantamento feito pelo INCA, cerca de 59.700 novos casos são estimados para o biênio 2018-2019, representando 29,5 % dos casos de câncer diagnosticados entre as mulheres (INCA, 2018) (Figura 1.1). Diferentes fatores de risco estão associados ao desenvolvimento e prognóstico do câncer de mama, incluindo a idade, obesidade, exposição à radiação, consumo de álcool e um estilo de vida sedentário. Fatores genéticos também contribuem para o surgimento do câncer de mama familiar ou esporádico (Bettaieb *et al.*, 2017).



	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1.1: Estatística de incidência do câncer de mama no Brasil. Ministério da Saúde/INCA, 2018.

Assim como existe uma ampla gama de fatores de risco, os tumores de mama apresentam-se fenotipicamente heterogêneos e possuem diferentes evoluções clínicas (Perou *et al.*, 2000; Curtis *et al.*, 2012). Múltiplas e distintas moléculas contribuem para a diversidade histológica, comportamental e grau patológico desses tumores (Dai *et al.*, 2016). Desta forma, o câncer de mama pode ser estratificado em quatro subtipos: Luminal A, Luminal B, Her-2 e triplo-

negativo. Esta classificação baseia-se na caracterização imunohistoquímica quanto à presença dos receptores hormonais estrógeno e progesterona e do receptor de fator de crescimento epidermal Her-2 (Kwa *et al.*, 2017). O subtipo Luminal A apresenta a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona, mas não apresenta superexpressão de Her-2, enquanto que o Luminal B apresenta expressão dos receptores hormonais e superexpressão de Her-2. Os subtipos luminais representam cerca de 75% dos casos de câncer de mama e são tumores bem diferenciados e pouco agressivos, quando comparados com os outros subtipos (Dunnwald *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2016). Para os tumores luminais, o tratamento adjuvante com tamoxifeno ou inibidores de aromatase apresentam-se eficientes em pacientes diagnosticados em estádios iniciais da doença (Gradishar *et al.*, 2015). O subtipo Her-2 apresenta superexpressão da proteína Her-2 ou amplificação do gene que a codifica, porém ausência de receptores hormonais. Este subtipo acomete cerca de 20% dos casos de câncer de mama e está associado a um prognóstico ruim. Entretanto, o tratamento com a terapia alvo-específica, baseado na utilização de anticorpos humanizados, como o trastuzumabe, tem-se mostrado eficiente para os casos diagnosticados em estádios iniciais (Mitri *et al.*, 2012). O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal que se liga aos receptores Her-2 impedindo sua dimerização e consequente ativação de vias intracelulares que promovem o crescimento celular (Slamon *et al.*, 2011). O quarto subtipo, triplo-negativo, é o mais heterogêneo, apresentando às pacientes acometidas maior probabilidade de recaída e menor sobrevida (Bettaieb *et al.*, 2017). Isto se deve a apresentação de um curso clínico agressivo e à ausência de expressão dos receptores de estrógeno, progesterona e Her-2 e, conseqüentemente, a necessidade de uma terapia direcionada. O tratamento adjuvante e neoadjuvante baseiam-se em ciclos dos quimioterápicos antraciclina e taxanos, mas devido a heterogeneidade dos pacientes, diferentes desfechos clínicos são observados (Gradishar *et al.*, 2015).

Outras moléculas bastante estudadas nesta neoplasia são p53 e Ki67. Ambas são importantes reguladores da proliferação tumoral e têm sido utilizadas para melhor caracterizar o grau de agressividade do tumor e aperfeiçoar o prognóstico e predição de resposta ao tratamento (Wang *et al.*,

2015; Muftah *et al.*, 2017). O gene *TP53* codifica a proteína supressora tumoral p53, que pode ser ativada em resposta a um dano ao DNA, estresse oxidativo ou hipóxia, por exemplo, ocasionando um arresto do ciclo celular ou morte celular programada (Wang *et al.*, 2015). Mutações neste gene são muito frequentes em diversos tipos de tumores e, no câncer de mama, essas mutações representam 25-30% dos casos (Langerød *et al.*, 2007). Tumores com mutação da *TP53* estão associados a um fenótipo mais agressivo, a um pior desfecho clínico, com metástases para linfonodos axilares, alto grau histológico e a um maior volume tumoral (Silwal-Pandit *et al.*, 2014). Dentre os subtipos, as mutações em *TP53* estão relacionadas a uma elevada taxa de mortalidade entre os pacientes Luminal B, Her-2 e triplo negativo (Silwal-Pandit *et al.*, 2016). A proteína Ki67 encontra-se expressa no compartimento nuclear de células que estão proliferando, porém ausente em células quiescentes, tornando-se um importante marcador de crescimento celular (Kill, 1996; Juríková *et al.*, 2016). A expressão de Ki67 oscila durante as fases do ciclo celular, não sendo encontrada durante a fase G0 e fase inicial de G1. Sua expressão inicia-se na fase G1 e aumenta ao longo da fase S, atingindo níveis máximos na metáfase. Por fim, durante a anáfase e telófase, a expressão de Ki67 começa a diminuir (Gerdes *et al.*, 1984; Starborg *et al.*, 1996). Desta forma, elevados níveis proteicos de Ki67 têm sido correlacionados com progressão tumoral, metástase de linfonodos axilares e curta sobrevida de pacientes com câncer de mama (Inwald *et al.*, 2013; Tawfik *et al.*, 2013). A avaliação da expressão de Ki67 por imunohistoquímica, juntamente com os receptores de estrógeno, progesterona e Her-2, tem sido utilizada para diferenciar o subtipo Luminal A (prognóstico favorável e baixa proliferação) do subtipo Luminal B (prognóstico desfavorável e alta proliferação) (Coates *et al.*, 2015). A partir desta avaliação, o tratamento a ser administrado pode ser definido, optando-se por quimioterapia combinada com hormonioterapia ou somente hormonioterapia (Penault-Llorca & Radošević-Robin, 2016).

Alterações genéticas também contribuem para a proliferação e tumorigênese do câncer de mama. Os genes *BRCA1* e *BRCA2* (Breast Cancer Gene 1 e 2) são supressores tumorais que atuam no reparo de lesões ao DNA e na proliferação celular (Welch *et al.*, 2000; Venkitaraman, 2002).

Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* estão relacionadas com o aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama familiar, representando entre 40% e 80% deste total (Venkitaraman, 2002; Cornejo-Moreno, 2014).

1.1.2 Tratamento quimioterápico do câncer de mama: Doxorrubicina e Docetaxel

O tratamento do câncer de mama envolve diversas modalidades terapêuticas, como a cirurgia, radioterapia, quimioterapia citotóxica, terapia-alvo e hormonioterapia (Moreno-Aspitia & Perez, 2009). No que se refere ao tratamento com quimioterápicos, o protocolo empregado baseia-se nas antraciclina associadas aos taxanos ou à ciclofosfamida e fluorouracil (Burnell *et al.*, 2010). Dentre as antraciclina, a doxorrubicina (DOX) e dentre os taxanos, o docetaxel (DTX) são os quimioterápicos empregados para o tratamento do câncer de mama no INCA.

A DOX é um quimioterápico da classe das antraciclina cujos mecanismos de ação incluem a indução de morte celular a partir da intercalação de DNA, formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) e através da ligação à topoisomerase II, impedindo que a síntese do DNA ocorra de forma correta (Gewirtz, 1999; Sawyer, 2013; Stěrba *et al.*, 2013). Apesar de eficiente na indução de morte de células cancerosas de mama, a DOX também tem sido associada com toxicidade a cardiomiócitos. Os cardiomiócitos são altamente enriquecidos com mitocôndrias, devido a seu intenso metabolismo, de forma que a geração de EROs causa fragmentação mitocondrial e conseqüente cardiotoxicidade (Kuzmicic *et al.*, 2011). Ademais, a porção β da topoisomerase II, tem importante função na manutenção estrutural dos cardiomiócitos. Desta forma, ao intercalar-se ao DNA, a DOX pode cessar a divisão celular, levando à ativação de mecanismos relacionados à morte (Sawyer, 2013; Vejpongsa & Yeh, 2014). Diferentemente de outras células, os cardiomiócitos apresentam baixa capacidade de regeneração, agravando os efeitos tóxicos do tratamento (Chiong *et al.*, 2011). Conseqüentemente, pacientes submetidos ao tratamento com DOX apresentam arritmia e perda de função contrátil ventricular (Li *et al.*, 2002;

Murtagh *et al.*, 2016). Além dos efeitos tóxicos, a resistência aos quimioterápicos é considerada um obstáculo para a efetividade do tratamento (Wang *et al.*, 2011).

O DTX, por sua vez, pertence à família dos taxanos, e tem sido utilizado como neoadjuvante ou adjuvante no tratamento do câncer de mama em associação às antraciclinas (Bayet-Robert *et al.*, 2010). Seu mecanismo de ação consiste em ligar-se à β -tubulina dos microtúbulos impedindo a dimerização com a α -tubulina, processo fundamental para que a divisão celular ocorra (Nogales *et al.*, 1998). Para células tumorais de mama, MCF-7 e MDA-MB-231, os efeitos do tratamento com o DTX dependem da concentração utilizada. Quando administrado em baixas concentrações (2 - 4 nM), o DTX induz acúmulo de células na região sub-G₀, causando mitose aberrante e aneuploidia. Em contrapartida, em concentrações clínicas (100 nM), o DTX causa parada mitótica na fase G₂/M, induzindo morte celular (Shalli *et al.*, 2005; Hernández-Vargas *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2012). Trabalhos têm mostrado que o tratamento com DTX provoca injúria em células hematopoiéticas como resultado do aumento de estresse oxidativo. Como reflexo desse dano, pacientes em tratamento podem apresentar anemia, trombocitopenia e neutropenia (Panis *et al.*, 2011). Ademais, cerca de 50% das pacientes não respondem de forma eficiente ao tratamento devido aos mecanismos de resistência inerentes ou adquiridos pelas células tumorais mediante o tratamento com DTX (O'Brien *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2014).

1.2 Mecanismos de resistência aos quimioterápicos

Mecanismos de resistência a múltiplas drogas têm sido apontados como responsáveis pela ineficiência da quimioterapia em cerca de 80 a 90% de pacientes com câncer de mama metastático (Longley & Johnson, 2005; Cherdyntseva *et al.*, 2017). Além de não haver resposta eficiente a um determinado quimioterápico, a prolongada exposição a mais de uma droga durante a quimioterapia pode resultar em um fenômeno de resistência cruzada, que consiste na resposta ineficaz a diferentes compostos que agem por mecanismos diversos e apresentam estruturas distintas (Riordan & Ling, 1985;

Zahreddine & Borden, 2013). Múltiplos mecanismos moleculares estão envolvidos na indução da quimiorresistência, incluindo a inibição de proteínas supressoras de tumor (Silwal-Pandit *et al.* 2014), alterações no ciclo celular e nos pontos de checagem (Vogel *et al.*, 2005), desregulação da expressão e função de fatores de transcrição FOX (Park *et al.*, 2012), superexpressão das proteínas inibidores de apoptose (Shi *et. al.*, 2007), e de bombas de efluxo, como a glicoproteína P (Pgp) (Gottesman, 2002). (Figura 1.2)

A origem da resistência a múltiplas drogas pode ser intrínseca ao paciente ou resultar da exposição a fatores externos, adquirida ao longo do tratamento. Como fatores intrínsecos ao paciente inclui-se a defasada absorção ou extrusão, bem como, a rápida metabolização da droga e uma falha no *delivery* da droga ao sítio do tumor (Gottesman, 2002). A resistência adquirida pode ocorrer por seleção clonal das células que não respondem à droga, ou a mutações posteriores em genes supressores tumorais, oncogenes ou genes de reparo (Holohan *et al.*, 2013). Como exemplo, o gene *TP53*, que codifica a proteína p53, pode apresentar mutações em 50% dos casos de câncer (Vousden & Lu, 2002) e no câncer de mama essas mutações representam 25-30% dos casos, como citado anteriormente (Langerød *et al.* 2007). Mutações pontuais nesse gene estão associadas a um pior prognóstico e baixa resposta ao tratamento quimioterápico (Coutant *et al.*, 2011). A p53 interage com o receptor de morte transmembranar Fas e proteínas sinalizadoras pró-apoptóticas Bak e Bax (Bouvard *et al.*, 2000) permitindo que a apoptose ocorra. Além de seu papel chave como regulador de morte celular, a p53 é requerida durante o ciclo celular para a transcrição de p21^{WAF-1/CIP-1} e ambas induzem parada no ciclo celular em resposta a danos ao DNA (Wang *et al.*, 2015). Mutações em *TP53* podem resultar na inativação ou disfunção dos mecanismos de apoptose e na regulação do ciclo celular, contribuindo para a resistência a multiplas drogas (He *et al.*, 2017). Como a p53 é também ativada a partir da sinalização do estresse oxidativo, as mutações em seu gene estão associadas à resistência ao tratamento com antraciclinas, que têm como mecanismo de ação, a produção de EROs e ERNs (Chrisanthar *et al.* 2011; Lønning & Knappskog 2013).

Além de mutações em *TP53*, alterações conformacionais ou diminuição da expressão da topoisomerase II, assim como o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL e Survivina podem ocasionar ineficiência do tratamento e consequente resistência à DOX (Wang *et al.*, 2011; Alfaro *et al.*, 2013) (Figura 1.2). Mutações em β -tubulina são eventos clássicos que ocorrem na resistência ao DTX. Estas mutações inviabilizam a ligação do DTX à subunidade β da tubulina, permitindo assim que as células tumorais continuem em divisão celular (Shalli *et al.*, 2005). A β -tubulina é expressa em quatro diferentes isótipos (classe II,III, IVa, IVb, and VI) e a expressão diferenciada entre eles pode afetar a habilidade dos quimioterápicos ligarem-se ao sistema microtubular (Joe *et al.*, 2008). Também é sugerido que o aumento de expressão da classe III da β -tubulina afeta a estabilidade dos microtúbulos e impede a ação do DTX (Hasegawa *et al.*, 2003).

As bombas de efluxo da família *ATP-binding cassette* (ABC), que apresentam atividade dependente de ATP (adenosina-trifosfato), têm sido relacionadas com a resistência a taxanos e antraciclina no câncer de mama (Gottesman *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2016). Essas bombas são importantes componentes presentes na membrana plasmática ou membranas intracelulares, exercendo um papel na comunicação entre o meio extracelular e o citoplasma ou entre organelas e o citoplasma, respectivamente (Chen *et al.*, 2016). Dentre os diversos membros dessa superfamília, destacam-se a glicoproteína P (Pgp), codificada pelo gene *MDR-1*, também chamado *ABCB1*, a proteína 1 associada à resistência às múltiplas drogas (MRP-1), codificada pelo gene *ABCC1* e a proteína associada à resistência no câncer de mama (BCRP), codificada pelo gene *ABCG2* (Vtorushin *et al.*, 2014).

Em células tumorais, a elevada expressão e atividade da Pgp têm sido amplamente relacionada à resistência a múltiplas drogas, devido à sua capacidade de extrair quimioterápicos e reduzir a concentração intracelular dos mesmos (Gottesman *et al.*, 2002). Além disso, a resistência adquirida está amplamente relacionada ao aumento dos níveis de Pgp em pacientes após a administração da quimioterapia (Kim *et al.*, 2013). Em tumores de mama, foi demonstrado que aproximadamente 40% das pacientes expressam *ABCB1*, e que sua expressão está envolvida com um pior prognóstico e ineficiência do

tratamento (Troick, 1997; Tsyganov *et al.*, 2017). Por ser dependente de ATP, a atividade da Pgp pode ser modulada a partir do metabolismo energético celular, e esta parece ser uma estratégia para sobrepujar a resistência aos quimioterápicos (Maximchik *et al.*, 2016). Em células MCF-7 resistentes à DOX, a inibição da síntese de ATP mitocondrial resultou em acúmulo intracelular de DOX, sugerindo a ineficiência de atividade da Pgp. Em contrapartida, na presença de ATP, baixas quantidades de DOX foram encontradas no interior da célula (Dartier *et al.*, 2017).

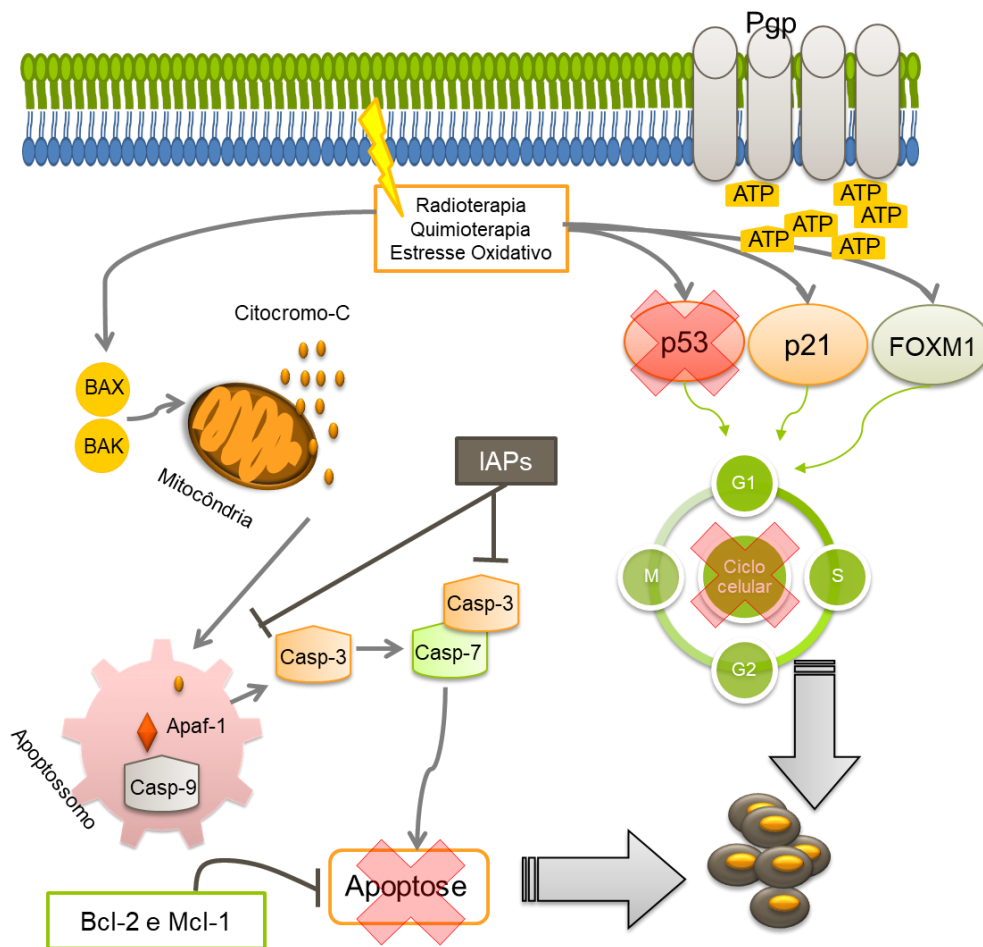


Figura 1.2: Mecanismos envolvidos na resistência ao tratamento quimioterápico do câncer de mama. A superexpressão de glicoproteína P (Pgp) e intensa atividade desta bomba de efluxo, a desregulação da proteína p53, as alterações nos pontos de checagem do ciclo celular, a desregulação de fatores de transcrição FOX, como FOXM1, a inibição da apoptose pela superexpressão de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (Bcl-2 e Mcl-1) ou proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) são alguns dos processos envolvidos na resistência à múltiplas drogas e na diminuição da eficiência do tratamento quimioterápico.

1.2.1 Alterações no ciclo celular e nos pontos de checagem

Células que apresentam características fisiológicas inalteradas, em geral, não proliferam na ausência de estímulos de crescimento. Entretanto, alguns oncogenes podem mimetizar esses sinais, levando a proliferação celular de forma não programada (Hanahan & Weinberg, 2000). O ciclo celular é regulado por quinases serina/treonina que são ativadas por subunidades de ciclinas (quinases dependentes de ciclinas: CDKs). As ciclinas se ligam de forma específica às CDKs, originando complexos ciclinas-CDKs, que ativam proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular (Malumbres, 2014). Para dar início ao ciclo celular, uma célula quiescente recebe um estímulo externo ou mitógeno e, desta forma, inicia-se a fase G1. Este estímulo pode ocorrer a partir da ativação de um receptor hormonal esteroide, ou de vias de sinalização como: RAS/MAPK e Rho-GTPase (Aktas *et al.*, 1997; Marshall, 1999; Whittaker *et al.*, 2017). A ativação da via de MAPK promove a complexação entre ciclina D e CDK4/6, culminando na fosforilação da proteína do retinoblastoma (RB). Após a hiperfosforilação de RB, o fator de transcrição E2F é liberado, possibilitando a progressão do ciclo celular para a fase G1/S (Figura 1.3) (Balmano & Cook, 1999; Malumbres & Barbacid, 2009).

O complexo ciclina D-CDK4/6 também fosforila o fator de transcrição FOXM1, envolvido na progressão do ciclo celular nas fases G1/S, e está relacionado à tumorigênese de diferentes tipos celulares de câncer de mama (Anders *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2015; Saba *et al.*, 2016). Em células MCF-7 resistentes à DOX (MCF-7 Dox^R) e paclitaxel (MCF-7 Tax^R), elevados níveis proteicos de FOXM1 foram associadas ao fenótipo de resistência dessas linhagens (Figura 1.3) (Nestal de Moraes *et al.*, 2015). Esses dados corroboram com a correlação deste fator de transcrição com um pior prognóstico e resistência a quimioterápicos em pacientes com estágios avançados de carcinoma invasivo de mama (Bergamaschi *et al.*, 2014; Nestal de Moraes *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2015; Saba *et al.*, 2016).

Cerca de 70% dos tumores de mama expressam receptores hormonais, e estes são importantes agentes mitógenos que estimulam a progressão do ciclo celular. Deste modo, a terapia hormonal utilizando o tamoxifeno ou

inibidores de aromatase, atua na inibição de receptores hormonais, e como consequência, controla a progressão celular na fase G1/S (Zafonte *et al.*, 2000; Doisneau-Sixou *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2015). O subtipo triplo negativo do câncer de mama apresenta alterações, tais como: mutações frequentes em *TP53*, que resultam na desregulação do ciclo celular na fase G1/S mediado por p21 (Figura 1.3) (Herold *et al.*, 2013). Alterações na regulação do ponto de checagem G1/S podem resultar na resistência ao tratamento com inibidores hormonais (Doisneau-Sixou *et al.*, 2003).

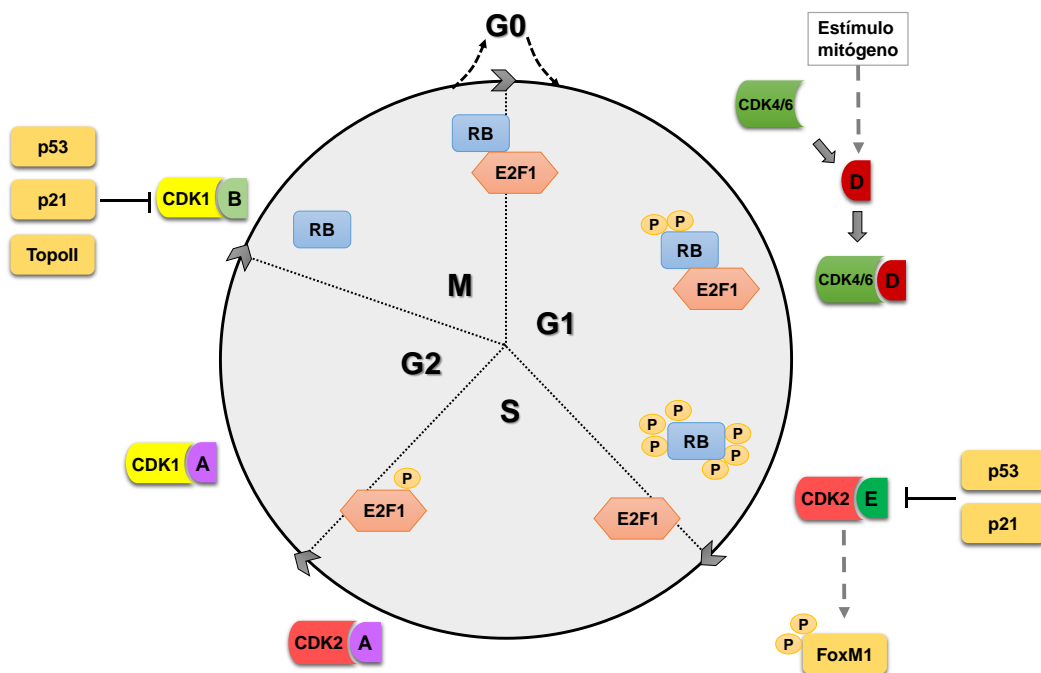


Figura 1.3: Desenho esquemático do ciclo celular. Estímulos mitógenos resultam na síntese de ciclina-D, que se complexa com a quinase dependente de ciclinas 4/6 (CDK4/6). Este complexo estimula a fosforilação da proteína do retinoblastoma (RB) durante o início da fase G1. Durante períodos mais tardios de G1, a ciclina-E é sintetizada e estimula a formação do complexo CDK2-ciclina E, que contribui para a hiperfosforilação de RB, liberando o fator de transcrição E2F1, dando início à fase de síntese do DNA. Este complexo também fosforila FOXM1, um importante fator de transcrição envolvido na progressão celular em células tumorais de mama. Neste momento, ocorre o primeiro ponto de checagem do ciclo celular, recrutando proteínas de reparo, sinalização e arresto do ciclo celular, p53 e p21. Ao final da fase S, a formação do complexo CDK2-ciclina A fosforila E2F1 e inibe sua atividade. O início da fase G2/M é determinado pelo complexo CDK1-ciclina A e ao final de G2, início de M, ocorre complexação de CDK1-ciclina B, momento do ciclo que acontece outro importante ponto de checagem com envolvimento de topoisomerase II, p53 e p21, levando a um novo arresto no ciclo. Ao final do ciclo celular, ocorre defosforilação de RB, que se complexa novamente ao E2F1 e o ciclo é finalizado. Adaptado de Whittaker *et al.*, 2017.

Após a checagem do ciclo na fase G1/S, ocorre complexação da ciclina A ao CDK2 e posteriormente ao CDK1 em momentos tardios de S e início da fase G2 (Whittaker *et al.*, 2017). Entre as fases G2 e M há também um ponto de checagem importante para progressão do ciclo, ocasionado por proteínas inibidoras dos complexos ciclina-CDK. A proteína p53, que ativa transcricionalmente a p21, estimula a diminuição da fosforilação de CDK1, impedindo a progressão da mitose (Figura 1.3) (Xiong *et al.*, 1993; Boulaire *et al.*, 2000). A superexpressão de FOXM1 promove degradação de proteínas p21 e p27, resultando na formação do complexo ciclina B-CDK1, essencial para a progressão da fase G2/M do ciclo celular (Wang *et al.*, 2015). A parada na fase G2 ocorre também devido ao aumento da expressão de p53 em resposta a um dano ao DNA. Radiação ionizante e exposição de células à adriamicina são estratégias terapêuticas que promovem estresse intracelular e consequente parada nesta fase do ciclo (Flatt *et al.*, 2000).

Células tumorais não apresentam um perfil regular na distribuição do ciclo celular, dificultando o tratamento com estratégias que visam momentos específicos do ciclo celular (Ali *et al.*, 2017). Desta forma, trabalhos utilizando novas estratégias terapêuticas têm demonstrado resultados promissores estimulando a parada no ponto de checagem G2/M de células tumorais de mama (Carey *et al.*, 2017). Através da utilização de um derivado sintético da curcumina, Ali e colaboradores mostraram que o tratamento da linhagem tumoral MCF-7 acarretou em aumento dos níveis proteicos de p53, citocromo c e caspase-9. Adicionalmente, este composto preveniu a progressão do ciclo celular com parada na fase G2/M como consequência do aumento de p53 e atividade de p21 (Ali *et al.*, 2017). A modulação de CDK1 também ocorre através da ativação da topoisomerase II. CDK1 é uma enzima essencial que regula a topoisomerase II e é requerida durante a fase G2/M. A sua inibição causa parada do ciclo celular nesta fase (Anderson & Roberge, 1996). Desta forma, a inibição da topoisomerase II é uma importante estratégia terapêutica e neste contexto, a DOX tem sido amplamente utilizada (Gewirtz, 1999). A proteína supressora p53, além de estar envolvida na parada durante a fase G1/S e G2/M, também é reguladora da expressão de topoisomerase II (Gewirtz, 1999).

1.2.2 Resistência a apoptose

1.2.2.1 Apoptose

O termo “morte celular programada” foi designado para nomear o evento celular que tem início em momentos pré-determinados, locais específicos ou quando ocorre uma injúria celular levando à sinalização de mecanismos envolvidos com esse processo (Reed, 2002; Gewies, 2014). Também denominado apoptose, esse evento ocorre para manter a homeostase fisiológica durante o desenvolvimento dos animais, bem como eliminar células senescentes ou que contenham modificações no DNA e injúrias em seu aparato (Kerr *et al.*, 1972; Gewies, 2014). Este processo também é classificado como um tipo de morte silenciosa, pois não atinge outras células adjacentes, de forma que o processo ocorre unicamente em células que foram sinalizadas (Reed, 2002; Gewies, 2014). Células fagocíticas, macrófagos e neutrófilos, por exemplo, contribuem para este processo, evitando que o conteúdo celular extravase e acione mecanismos envolvidos com morte secundária por necrose ou ativação de citocinas pró-inflamatórias (Elmore, 2007).

Alterações morfológicas típicas de apoptose incluem a perda de adesão celular com a matriz extracelular e interação célula-célula, pois os filamentos de actina e lamina do citoesqueleto são clivados (Uren & Vaux, 1996; Cejalvo *et al.*, 2017). Em seguida, a cromatina sofre condensação e o núcleo apresenta-se picnótico. Por fim, corpos apoptóticos são formados, o DNA é fragmentado e a célula é fagocitada (Elmore, 2007). Para que a apoptose tenha início, diversas moléculas agem em conjunto, promovendo a sinalização. Estes mecanismos têm em comum a atividade de granzimas e perforinas, iniciada após a clivagem da caspase-3, que resulta nos eventos morfológicos acima citados (Hassan *et al.*, 2014).

1.2.2.2 Via extrínseca e intrínseca da apoptose

A apoptose pode ser ativada por diferentes vias, sendo as vias intrínseca e extrínseca as mais clássicas e bem compreendidas. A via extrínseca é

ativada a partir de um receptor de membrana, enquanto a via intrínseca envolve alterações de potencial de membrana mitocondrial (Kim, 2005) (Figura 1.4). A via extrínseca da apoptose é iniciada quando fatores externos estimulam a ativação dos receptores transmembrana, tais como FasR e o receptor do fator de necrose tumoral- α (TNFR-1) na presença de seus ligantes FasL e TNF- α respectivamente (Gearing *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1996; Schneider-Brachert *et al.*, 2013). Esta ligação resulta na ativação de domínios intracelulares adaptadores que irão ativar outras proteínas envolvidas com a cascata de sinalização. A ligação de FasL/FasR ativa o (FADD) e a ligação TNF- α /TNFR-1 ativa o domínio de morte associada ao TNFR (TRADD) (Schneider-Brachert *et al.*, 2013). Estes domínios intracelulares interagem com a procaspase-8 via dimerização do domínio efetor de morte (DED) e então, o complexo de sinalização de morte induzida (DISC) é formado. Este complexo cliva a procaspase-8 na forma ativa, caspase-8, e então a apoptose é desencadeada (Chang *et al.*, 2003).

A via intrínseca da apoptose é promovida a partir de estímulos independentes da ativação de receptores de membrana, que podem ser hormônios, toxinas, radiação, quimioterapia e radicais livres resultantes de danos celulares (Elmore, 2007). Estes fatores promovem sinais intracelulares mediados pela dimerização das proteínas pró-apoptóticas Bax (proteína X ligada à Bcl-2) e Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*), pertencentes à família Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), alterando o potencial da membrana mitocondrial tornando-a permeável e porosa (Cory *et al.*, 2003). Devido a essa alteração na permeabilidade da membrana, a mitocôndria libera fatores pro-apoptóticos para o citoplasma. As principais proteínas a serem liberadas são citocromo-c e *second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI* (Smac/DIABLO). O citocromo-c se liga a procaspase-9 e a outros fatores, como a fator ativador de protease da apoptose-1 (Apaf-1) resultando na formação de um complexo denominado apoptossomo. Esse complexo culmina na ativação por clivagem proteolítica da procaspase-9, que desencadeia a clivagem de outras procaspases como -3, -6 e -7, iniciando a degradação de substratos (Ow *et al.*, 2008) (Figura 1.4).

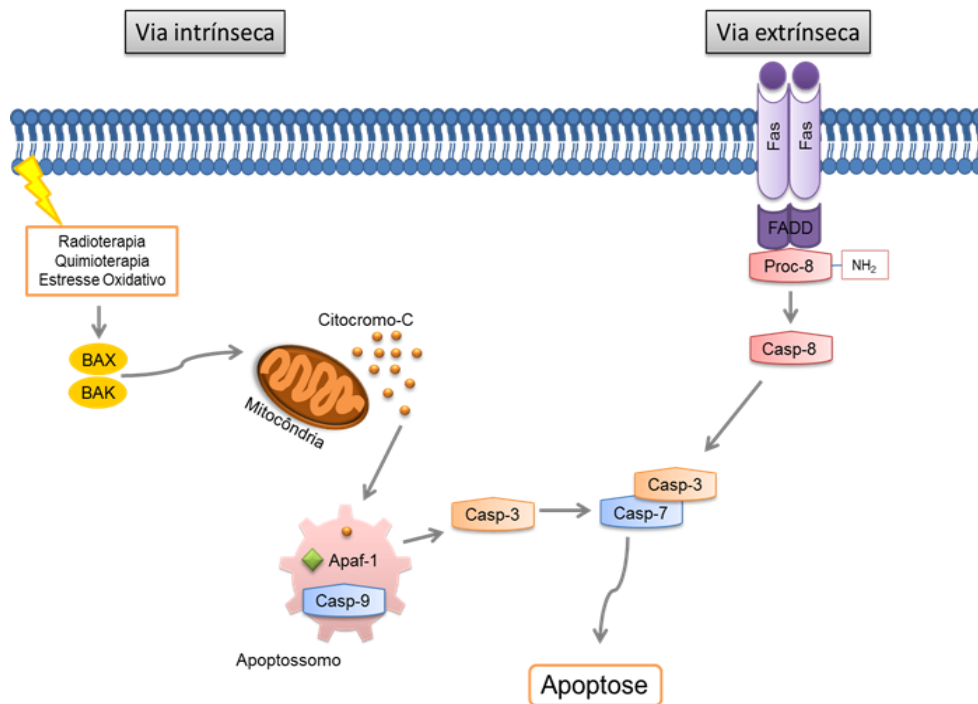


Figura 1.4: Vias intrínseca e extrínseca da apoptose. A figura ilustra como as vias intrínseca e extrínseca da apoptose são desencadeadas. A via intrínseca depende de um estímulo interno, como radioterapia, quimioterapia ou estresse oxidativo, que culmina com a ativação de BAK e BAX, desencadeando a saída de citocromo-c da mitocôndria. O citocromo-c, juntamente com o Apaf-1 e a caspase-9, formam um complexo denominado apoptossomo que ativa as caspases efetoras -3 e -7 resultando na apoptose. A via extrínseca é iniciada quando receptores de membrana como o Fas recebem seu ligante FasL, estimulando o recrutamento da FADD que cliva a procaspase-8 na sua forma ativa, a caspase-8. Por fim, as caspases efetoras -3 e -7 são ativadas, estimulando a apoptose. Apaf-1: fator ativador de protease da apoptose 1; Casp: caspase; FasL: Ligante de Fas; FADD: domínio de morte associado a Fas; Proc: procaspase.

No câncer de mama, as células transformadas apresentam diversos mecanismos que tornam a apoptose ineficiente e alguns deles podem estar relacionados com a redução da função das caspases ou não dimerização dos receptores de morte (Kadam & Abhang, 2016). Mutações em genes reguladores da apoptose também contribuem para a oncogênese. Ademais, alguns estudos mostraram acúmulo de mutações nos genes da p53 e Bcl-2 e que estes genes estão superexpressos em câncer de mama metastático (Wong, 2011).

1.2.2.3 Regulação da apoptose pelas proteínas inibidoras da apoptose (IAPs)

As proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) compõem uma família de proteínas que têm em comum a presença do domínio BIR (*baculoviral IAP repeat*). Estas proteínas foram primeiramente identificadas por Crook e seus colaboradores em 1993 e a partir de então, oito membros dessa família foram descritos na espécie humana (Figura 1.5) (Crook *et al.*, 1993). As proteínas XIAP, c-IAP1 (proteína 1 celular inibidora da apoptose), c-IAP2 (proteína 2 celular inibidora da apoptose), ML-IAP (IAP de melanoma), Survivina, ILP2 (proteína *IAP-like 2*), NAIP (proteína inibidora da apoptose neuronal), e Apollon (enzima conjugada à ubiquitina contendo BIR) agem como inibidoras da apoptose, podendo atuar tanto na via intrínseca quanto na via extrínseca (Fulda & Vucic, 2012). A maioria dos membros desta família apresenta também o domínio RING (*Really Interesting New Gene*) que confere a essas proteínas a função ubiquitina E3 ligase e exerce um importante papel em vias de sobrevivência e sinalização celular (Duckett, *et al.*, 1996; Vaux & Silke, 2005).

Estruturalmente, a XIAP contém 3 domínios BIR (BIR1-BIR3), seguido por um domínio ubiquitina associado (UBA) e um domínio RING. XIAP, c-IAP1 e c-IAP2 contém o domínio CARD, enquanto que ML-IAP apresenta apenas um domínio BIR e um domínio RING (Vaux & Silke, 2005). XIAP é a única IAP que pode se ligar e agir diretamente com as caspases efetoras -3 e -7 inibindo sua atividade. c-IAP1 e c-IAP2 por intermédio dos domínios RING e CARD interagem com as caspases promovendo a sua inibição a partir da degradação do proteasoma (Figura 1.5) (Chai *et al.*, 2001; Silke *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2011).

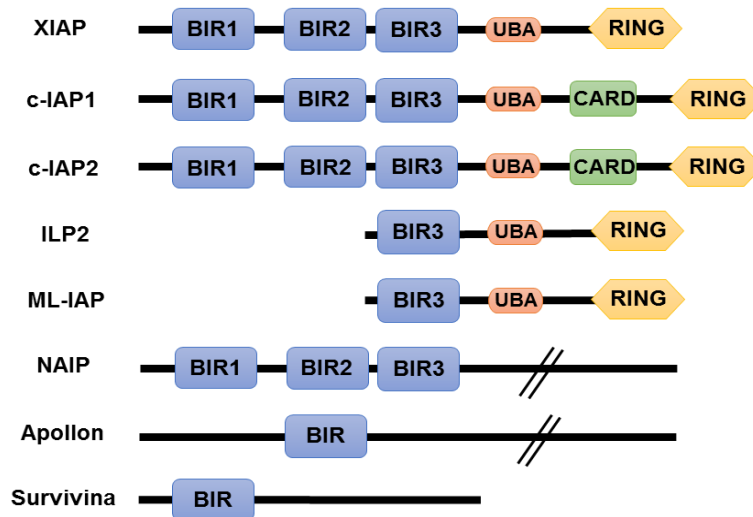


Figura 1.5: Membros da família das IAPs envolvidos com a regulação da apoptose. Esquema representativo das proteínas inibidoras da apoptose. BIR: *baculoviral IAP repeat*; UBA: domínio ubiquitina associado; CARD: domínio ativador de recrutamento de caspases; RING: *Really Interesting New Gene*.

Os membros mais estudados da família das IAPs são XIAP, c-IAP1, c-IAP2 e Survivina, que apresentam-se superexpressos em diversos tipos de tumores, como próstata, pâncreas, tumores gástricos, melanoma e mama dificultando a eficiência do tratamento (Pluta *et al.*, 2015). No câncer de mama, essas proteínas estão correlacionadas com um pior prognóstico e estágios mais avançados da doença (Wang *et al.*, 2012). A XIAP está presente em cerca de 84,3% dos casos de carcinoma de mama ductal invasivo e está associada aos tumores que apresentam receptores de estrógeno (Zhang *et al.*, 2011). Assim como a Survivina, tem sido demonstrado que a superexpressão da XIAP está relacionada com câncer de mama em estágios avançados, como por exemplo, grau 3 em carcinoma ductal (Pluta *et al.*, 2015). Pluta e colaboradores demonstraram que existe uma correlação significativa entre os níveis protéicos de XIAP e c-IAP1 entre as amostras de tecido tumoral das pacientes estudadas, indicando a interação entre essas proteínas. Ainda no mesmo trabalho, Pluta demonstrou a presença de altos níveis protéicos de c-IAP2 em amostras de pacientes com linfonodos acometidos (Pluta *et al.*, 2015). Ademais, a superexpressão de Survivina foi associada a tumores de mama com subtipo triplo negativo, que apresentaram maior volume da massa tumoral, alto grau histológico e acometimento de linfonodos (Youssef *et al.*, 2008; Adamkov *et al.*, 2012).

As IAPs apresentam diferentes mecanismos de regulação negativa da apoptose. As proteínas c-IAP1 e cIAP-2, ligam-se aos fatores associados a TNFR 1 e 2 (TRAF1 e TRAF2) dando origem a um complexo supressor da atividade da caspase-8 (Micheau & Tschopp, 2003). Esse complexo leva à ubiquitinação do receptor de interação com a proteína 1 (RIP1) recrutando o complexo enzimático I κ B quinase (IKK) que resulta na ativação da via canônica de NF κ B e seus genes alvo envolvidos com sobrevivência celular e inflamação (Bertrand *et al.*, 2008; Gyrd-Hansen & Meier, 2010). Trabalhos têm demonstrado que oligonucleotídeos e pequenas moléculas miméticas de Smac/DIABLO, têm sido promissores no tratamento *in vivo* e *in vitro* do câncer de mama, por apresentar atividade antagonista a c-IAP1 (Tamanini *et al.*, 2017). A inibição dos níveis de expressão dos genes de ativação de c-IAP1 por compostos naturais como Triptolide sensibilizam células de câncer de mama à apoptose (Cheng *et al.*, 2016). O tratamento de células MCF-7 e MDA-MB-231 com LCL161, um composto mimético de Smac que se liga a c-IAP1/2, resulta em alteração conformacional e degradação proteossomal dessas proteínas. Como consequência, ocorre um acúmulo de RIP1 seguido por ativação de processos de morte celular (Jin *et al.*, 2016). Adicionalmente, a c-IAP1 interage diretamente com o fator de transcrição 1 de E2F (E2F1) e estimula a atividade transcricional recrutando os complexos relacionados a ciclinas E e A (CCNE e CCNA). Estes genes são importantes reguladores da progressão do ciclo celular promovendo a transição da fase G1 para fase S do ciclo celular (Cartier *et al.*, 2011). Portanto, outra importante função de c-IAP1 está associada à progressão do ciclo celular.

A XIAP é o membro protótipo da família das IAPs, sendo capaz de se ligar e inibir diretamente as caspases (Obexer & Ausserlechner, 2014). Essa proteína apresenta três domínios BIR (1, 2 e 3) e interfere nos estágios finais da cascata da apoptose, ligando-se à caspase iniciadora -9 via domínio BIR3 e também às efetoras -3 e -7 via BIR2 (Scott *et al.*, 2005, Eckelman *et al.*, 2006). O domínio BIR3 interage com Apaf-1/caspase-9 por sequestrar a porção N-terminal da subunidade pequena da caspase-9. Esta região da caspase apresenta homologia com a Smac/DIABLO, sugerindo que esses dois sítios de ligação competem com a interação entre XIAP e BIR3. Portanto, a

Smac/DIABLO pode agir como antagonista da função antiapoptótica da XIAP (Srinivasula *et al.*, 2001; Lukacs *et al.*, 2013). Outro importante mecanismo através do qual a XIAP pode inibir a atividade das caspases é a partir da atividade E3 ligase do domínio RING. Células depletadas para este domínio apresentam aumento de atividade de caspase-3 e aumento de sensibilidade ao TNF, sugerindo que os níveis de XIAP intracelular interferem nas vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose (Schile *et al.*, 2008). Utilizando modelos *in vitro* 3D e *in vivo*, Arora e colaboradores demonstraram que a superexpressão de XIAP, dentre outros fatores, contribui para a sobrevivência de células tumorais de mama e, que a sua inibição impacta a proliferação celular, como avaliado por modelos tridimensionais de culturas celulares (Arora *et al.*, 2017). Como mencionado anteriormente, miméticos de Smac também têm sido alvo de estudos, pois estimulam mudanças conformacionais nas IAPs levando-as a autoubiquitinação e degradação proteasomal (Bai *et al.*, 2014; Fulda, 2015). Além disso, esses miméticos podem se ligar e agir diretamente na XIAP inibindo sua interação com as caspases (Bai *et al.*, 2014; Fulda, 2015).

A Survivina, por sua vez, apresenta diferentes funções de acordo com sua localização celular. Quando presente no núcleo pode agir como reguladora do ciclo celular, enquanto que no citosol a Survivina pode agir como inibidora da apoptose (Mahotka *et al.*, 2002). A Survivina compõe o complexo cromossomal juntamente com INCENP (proteína interna do centrômero), Aurora quinase B e borealina, que é imprescindível para a separação cromossômica durante a citocinese da divisão celular (Li *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 2006; Kitagawa, 2015). Além disso, uma fração de Survivina subcelular está associada com a tubulina polimerizada e regula a formação das fibras do fuso mitótico durante a divisão celular (Mita *et al.*, 2008). No que tange à sua função antiapoptótica, a Survivina não é capaz de se ligar diretamente às caspases, porém promove uma inibição indireta ligando-se a cofatores e proteínas intermediárias. A Survivina pode mediar a ligação entre a XIAP e a procaspase-9 bloqueando a sua atividade (Marusawa *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004). Um importante mecanismo, envolvido com a inibição da via intrínseca da apoptose, consiste na ligação da Survivina à proteína pró-apoptótica Smac/DIABLO, prevenindo a liberação do citocromo-c e consequente ativação

das caspases (Johnson *et al.*, 2004). A Survivina também apresenta variantes de splicing e estas estão associadas a diferentes funções na tumorigênese do câncer de mama. (Végran *et al.*, 2011). Estratégias terapêuticas utilizando novos compostos derivados de extratos orgânicos têm se mostrado promissores no tratamento *in vitro* de células de câncer de mama. Kang e colaboradores mostraram a morusina induziu morte celular por apoptose para células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 por inibição da Survivina e aumento da proteína pró-apoptótica Bax (Kang *et al.*, 2017).

Os demais membros das IAPs, como ILP2, NAIP e Apollon podem ter funções relacionadas à regulação da progressão de ciclo celular, proliferação celular e regulação do sistema imune (Fulda & Vucic, 2012; Abadía-Molina *et al.*, 2017). Entretanto, o papel dessas proteínas não está bem elucidado, bem como a sua importância no contexto que envolve o tratamento e a resistência do câncer de mama.

1.2.2.4 Regulação da apoptose pelos membros da família Bcl-2

A família Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) compreende proteínas envolvidas em diferentes processos fisiológicos, tais como autofagia, proliferação celular, regulação de ciclo celular e modulação da resposta imune (Hatok & Racay, 2016). Entretanto, a função inicialmente descrita para esta família está relacionada à apoptose, regulando a integridade da membrana mitocondrial (Gross & Katz, 2017). Os membros da família Bcl-2 possuem domínios homólogos de Bcl-2 (BH) enumerados de 1 a 4, podendo apresentar também um domínio transmembrana (TM) (Youle *et al.*, 2008) (Figura 1.6). De acordo com a estrutura e função, seus membros podem ser classificados em três diferentes subgrupos: proteínas que exercem atividade pró-apoptótica e que apresentam múltiplos domínios BH, como a BAK (*Bcl-2 antagonist/killer*), BAX (*Bcl-2-associated X protein*) e BOK (*Bcl-2 related ovarian killer*); proteínas pró-apoptóticas que apresentam somente o domínio BH3, como por exemplo, BIM (*Bcl-2-like protein 11*), BID (*BH3 interacting domain death agonist*) e PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) e as que apresentam função antiapoptótica, como Bcl-2 propriamente dito, Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra*

large) e Mcl-1 (myeloid cell leukaemia-1) (Shamas *et al.*, 2011; Delbridge *et al.*, 2016) (Figura 1.6).

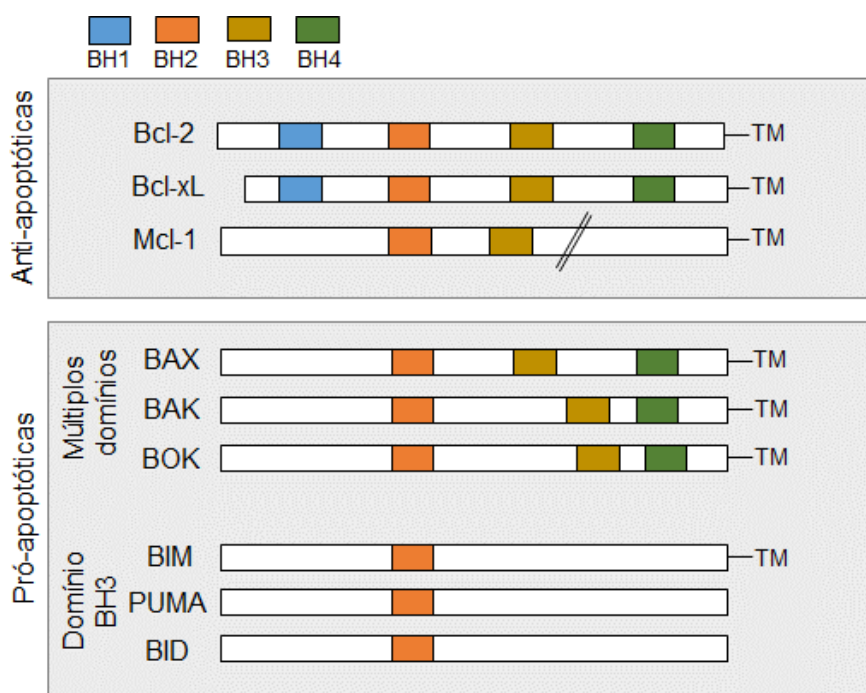


Figura 1.6: Membros da família Bcl-2. Figura ilustrativa dos membros da família Bcl-2. Dentre esta família, alguns de seus membros exercem atividade pró-apoptótica e apresentam múltiplos domínios BH, como a BAK, BAX e BOK; as proteínas pró-apoptóticas que apresentam somente o domínio BH3, como BIM, BID e PUMA e as que apresentam função antiapoptótica: Bcl-2 propriamente dito, Bcl-xL e Mcl-1. BH: domínios homólogos de Bcl-2; TM: Domínio transmembrana.

A família Bcl-2 pode atuar em diferentes e importantes momentos da apoptose, com interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre domínios BH3. Este domínio apresenta duas funções, neutralização das proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 e ativação direta dos efetores pró-apoptóticos BAK e BAX (Vela & Marzo, 2015). A partir da dimerização de BAK e BAX, ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial, permitindo a saída do citocromo c (Kluck *et al.*, 1997; Hatok & Racay, 2016). No contexto do câncer de mama, estudos têm mostrado que o tratamento *in vitro* da linhagem MCF-7 com DOX promove diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da expressão de BAX (Thomadaki & Scorilas, 2007). De forma semelhante, o tratamento da linhagem MDA-MB-231 com paclitaxel, resulta no aumento dos

níveis de RNA mensageiro de BIM, proteína facilitadora da apoptose (Sunters *et al.*, 2003).

Os membros da família Bcl-2 estão envolvidos não somente com processos que resultam na apoptose, mediando a via intrínseca, como também regulam processos intracelulares envolvidos com a sobrevivência celular (Hatok & Racay, 2016). Bcl-2 e Bcl-xL são reconhecidos como reguladores antiapoptóticos, porém também atuam controlando a progressão do ciclo celular. Essas proteínas agem prolongando a fase G1 do ciclo celular e inibem a transição entre as fases G1 e S por inibição da ciclina CDK2 (*cyclin dependente kinase-2*), responsável pela transição desta fase (Borner, 1996; Janumyan *et al.*, 2003; Whittaker *et al.*, 2017). Assim como Bcl-2 e Bcl-xL, a Mcl-1 também inibe a progressão do ciclo celular que permanece em arresto na fase S (Fujise *et al.*, 2000). Mcl-1 é uma proteína antiapoptótica que, dentre outras funções, inibe a formação do dímero BAK e BAX, impedindo o início da via intrínseca da apoptose (Perciavalle & Opferman, 2013). Fisiologicamente, Mcl-1 é essencial para a embriogênese inicial, desenvolvimento e manutenção dos linfócitos, neurônios, fibroblastos e células-tronco hematopoiéticas (Belmar & Fesik, 2015). Mcl-1 possui uma região reguladora N-terminal que promove a fosforilação e ativação de outras proteínas (Thomas *et al.*, 2010). Apesar de desempenhar diferentes funções, seu papel antiapoptótico é o mais bem descrito e tem sido reconhecido como um obstáculo para o tratamento de células tumorais, já que o gene que codifica Mcl-1 encontra-se amplificado nessas células e este evento tem sido observado em diferentes tipos de câncer, como leucemias, próstata, pulmão, pâncreas, ovário e câncer de mama (Belmar & Fesik, 2015). A superexpressão de Mcl-1 em câncer de mama tem sido associada ao grau avançado do tumor ao diagnóstico e à baixa sobrevivência das pacientes (Ali *et al.*, 2016; Campbell *et al.*, 2018). Recentemente, foi descrito que células de mama resistentes aos taxanos apresentam altos níveis proteicos de Mcl-1 (Ding *et al.*, 2007; Gasca *et al.*, 2016). Com exceção do gene *TP53*, o *MCL-1* é o gene que mais apresenta amplificação após a terapia neoadjuvante em tumores triplo-negativos (Balko *et al.*, 2014). Ademais, o *MCL-1* apresenta amplificação em 9% dos casos diagnosticados com o subtipo Luminal B e entre 20-55% dos tumores de mama triplo-negativos (Balko *et al.*,

2014). Em células que superexpressam Her2, o Mcl-1 pode prevenir morte induzida por hipóxia (Bashari *et al.*, 2016). Além disso, a superexpressão de Mcl-1 implica na resistência a diversas drogas, como paclitaxel e vincristina (Wertz *et al.*, 2011).

Devido à sua função antiapoptótica e correlação com a resistência a múltiplas drogas, as proteínas da família Bcl-2 têm sido consideradas importantes alvos terapêuticos, na tentativa de sobrepujar o fenótipo de resistência e tornar as células sensíveis à quimioterapia (Williams *et al.*, 2017). A inibição farmacológica dessas proteínas tem sido promovida por diferentes estratégias, dentre elas, por intermédio de pequenos compostos que se ligam ao domínio BH3, domínio característico da família Bcl-2. Esses compostos são chamados de miméticos de BH3 e permitem que a ativação da apoptose ocorra (Oltersdorf *et al.*, 2005). A inibição de Mcl-1, Bcl-2 e Bcl-xL a partir de diferentes miméticos mostrou-se eficiente na ativação de caspase-3, proteína efetora da apoptose, e na sensibilização de células tumorais de mama com fenótipo de resistência ao tratamento com os quimioterápicos (Juin *et al.*, 2013; Vaillant *et al.*, 2013; Vela *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2016; Panayotopoulou *et al.*, 2017). Alguns destes miméticos de BH3 encontram-se em estudos clínicos, dentre eles o ABT-263 (Navitoclax), que inibe Bcl-2, Bcl-X_L e Bcl-w e induz apoptose em tumores hematológicos, como linfoma difuso de células B e em tumores sólidos, como câncer de pulmão de não pequenas células (Quentmeier *et al.*, 2016; Rudin *et al.*, 2012). A indução de apoptose mediante a inibição das proteínas da família Bcl-2 tem sido considerada uma abordagem terapêutica potencialmente promissora, não somente por induzir a morte das células neoplásicas, mas também por reverter à resistência ao tratamento vigente. Diversos agentes tem mostrado eficácia em estudos pré-clínicos (Punnoose *et al.*, 2016) e clínicos (Mason *et al.*, 2009; Konopleva *et al.*, 2016).

1.3 Interface entre a resistência às drogas e o processo de invasão e metástase.

Durante a progressão tumoral, as células que compõem um tumor sólido e estão em intensa divisão celular, acumulam modificações traducionais e pós-traducionais que alteram seu perfil fenotípico. A alteração no padrão de expressão das proteínas contribui para que as células passem a apresentar características de perda de adesão, possibilitando a invasão de tecidos adjacentes e formando nichos metastáticos a partir do mesmo tumor (Hanahan & Weinberg, 2000; Cejalvo *et al.*, 2017). Um evento primordial para que as células escapem de seu nicho inicial e alcancem outros tecidos é a transição epitélio-mesênquima (TEM), que consiste na perda de alterações nas junções de adesão, polaridade apical-basal, com consequente ganho de motilidade e aquisição de fenótipo mesenquimal (Nieto, 2013). Alterações nas proteínas de adesão como: E-caderina, integrinas, desmossomos e *gap junctions* têm sido fortemente correlacionadas com a modulação do microambiente tumoral e resistência de células tumorais (Yeung & Yang, 2017) (Figura 1.7). A TEM é caracterizada, pela perda das características epiteliais das células, como redução de expressão das proteínas E-caderina, Claudina-3 e citoqueratinas e, em contrapartida, aumento da expressão de proteínas mesenquimais, como Vimentina, N-caderina, Snail, Slug e Twist (Wu *et al.*, 2016). Através da avaliação da expressão dessas proteínas nos diferentes subtipos do câncer de mama, por imunistoquímica, foi identificado que os marcadores mesenquimais de TEM estão relacionados ao subtipo triplo negativo e ao fenótipo mais agressivo desses tumores (Sarrió *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013). Pioneiros em identificar a correlação entre TEM e resistência no câncer de mama, Sommers e colaboradores observaram que células MCF-7 resistentes à DOX apresentavam aumento dos níveis protéicos de vimentina, e redução da formação de desmossomos e junções de adesão (Sommers *et al.*, 1992).

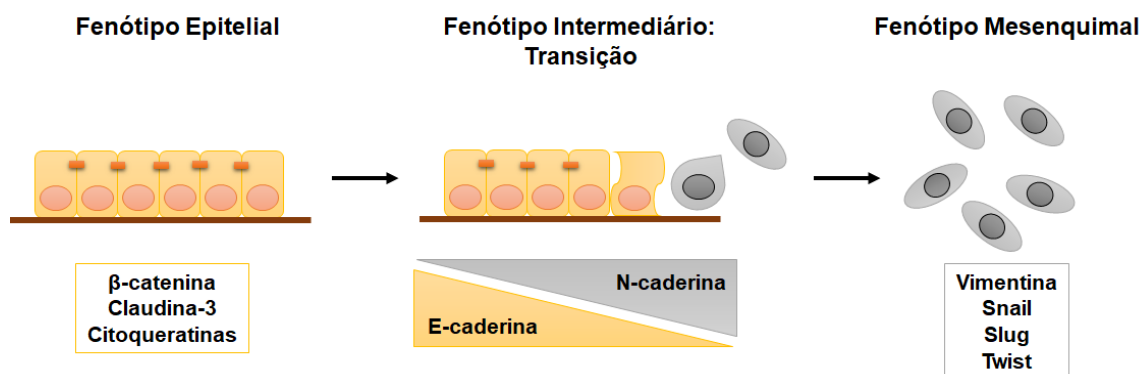


Figura 1.7: Desenho esquemático da transição epitélio-mesênquima (TEM). O desbalanço entre E-caderina e N-caderina é um importante evento na transformação celular durante a aquisição de características mesenquimais por células polarizadas. Células com o fenótipo epitelial apresentam expressão de junções de adesão, β-catenina, Claudina-3 e Citoqueratinas. Durante a aquisição do fenótipo mesenquimal, as células perdem as junções de adesão apresentam alterações na morfologia e rompem a barreira da matrix-extracelular. Essas alterações são acompanhadas de aumento de expressão de Vimentina, Snail, Slug e Twist. Adaptado de Wu *et al.*, 2017

A E-caderina é uma glicoproteína transmembrana que desempenha um importante papel na organização da estrutura epitelial. Esta proteína interage com outras E-caderinas de células adjacentes formando um importante componente das junções aderentes. Por recrutamento da α e β-catenina, a E-caderina é ancorada ao citoesqueleto de actina. Desta forma, ela apresenta um papel supressor da invasão ao transmitir sinais que inibem o crescimento entre as células adjacentes via contato citoplasmático (Yagi & Takeichi, 2000).

Desta forma, alterações ou inativação desta proteína, promovem a perda de adesão, aquisição da capacidade de crescimento desordenado, invasão e metástase de células epiteliais (Figura 1.7) (Christofori & Semb, 1999; Wu *et al.*, 2017). A diminuição da expressão da E-caderina, acompanhada da elevação de N-caderina, um marcador mesenquimal, contribuem para a perda de adesão entre células tumorais e este processo é observado em câncer de mama do subtipo triplo-negativo, bem como em tumores que superexpressam Her2 (Li *et al.*, 2017). Além de aumentar o potencial migratório de células triplo-negativas MDA-MB-231 e BT549, a diminuição dos níveis de E-caderina estão associados à resistência no câncer de mama (Lombaerts *et al.*, 2006; Ciriello *et al.*, 2015). Células MCF-7 e MDA-MB-231 superexpressando Twist, Snail e

FOXC2, apresentaram aumento da atividade e expressão de proteínas transportadoras da família ABC e passaram a não responder ao tratamento com DOX (Saxena *et al.*, 2011). Diversos estudos têm associado à superexpressão de bombas de efluxo, como a Pgp, a células de câncer de mama com características mesenquimais, sendo estas células resistentes à antraciclinas e taxanos (Li *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2014a). Ademais, a alta expressão e intensa atividade de N-caderina e diminuição ou mutações em E-caderina são eventos correlacionados com agressividade, elevada mortalidade e um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama (Onder *et al.*, 2008; Polyak & Weinberg, 2009; Hollestelle *et al.*, 2010; Ciriello *et al.*, 2015).

Outro importante regulador da progressão do ciclo celular é o fator de transcrição o FOXM1, que está também associado a um pior prognóstico, acometimento de linfonodos e menor sobrevida de pacientes com câncer de mama (Bergamaschi *et al.*, 2014; Ahn *et al.*, 2015). Além de regular a expressão de Snail, já foi demonstrado que a inibição de FOXM1 resultou na diminuição da migração de células de câncer de mama através da modulação de fatores envolvidos na degradação da matriz extracelular, MMP-2 e MMP-9 (Balli *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2010). Yang e colaboradores demonstraram que FOXM1 regula transcricionalmente Slug inibindo a expressão de E-caderina e levando a um aumento de expressão de Vimentina em células não neoplásicas de mama MCF10A. Ensaios *in vivo* demonstraram que a superexpressão de FOXM1 promove metástase de células tumorais de mama MCF-7 e em amostras de pacientes está superexpresso em tumores triplo-negativos, que apresentam características mesenquimais e metastáticas (Vuoriluoto *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2017).

Estudos envolvendo estratégias que têm por objetivo modular e inibir marcadores envolvidos na resistência a drogas e metástase têm sido propostos. Em células MCF-7 e MDA-MB-231, a salinomicina, reguladora negativa de proteínas associadas a TEM, diminuiu a expressão de BCRP aumentando a sensibilização dessas células à DOX (Hermawan *et al.*, 2016). Em outro estudo, a utilização de disulfiram, um membro da família ditiocarbamate, foi efetivo em reverter o fenótipo TEM de células tumorais de mama *in vitro* e *in vivo*, a partir da inibição de proteínas envolvidas no processo

de migração e quimiorresistência, como Snail e ERK (Han *et al.*, 2015). Em células MDA-MB-231 foi demonstrado que a inibição de FOXM1 resultou em células com características mais epiteliais, como maior expressão de N-caderina, menor potencial migratório e redução de RNAm da Vimentina, Slug, Snail e Twist (Yang *et al.* 2013).

Em conclusão, a resistência à múltiplas drogas está associada ao fenótipo mesenquimal de células tumorais, o que contribui para evasão e migração celular. A TEM pode contribuir para a recorrência de um tumor e para a metástase (Takebe *et al.*, 2011). A busca por novas estratégias terapêuticas que possam sobrepujar mecanismos de resistência a drogas e modular os processos relacionados à migração e invasão celular, é de extrema importância.

1.4 Interface entre as proteínas inibidoras da apoptose e o processo de migração e metástase

A TEM é caracterizada por eventos que estão relacionados à perda da polarização apical-basal e junções celulares, reorganização do citoesqueleto e regulação da motilidade, além da diminuição da expressão de marcadores epiteliais como E-caderina e superexpressão de marcadores mesenquimais, como Vimentina e N-caderina (Lima *et al.*, 2016). A adesão celular também é modificada durante a metástase de células tumorais, pois regula a proliferação celular e vias de sobrevivência mediadas por integrinas. As integrinas exercem importante papel regulatório da proliferação, sobrevivência e diferenciação celular através da sua interação com proteínas intracelulares como PI3K/AKT e p53/p63, que levam ao recrutamento de Snail, desencadeando a sobrevivência e migração celular (Li *et al.*, 2011, Banyard & Bielenberg, 2015).

Adicionalmente ao potencial migratório, além de evadir a apoptose, células em TEM regulam mecanismos de senescência. O fator de transcrição Twist pode inibir proteínas supressoras e reguladoras do ciclo celular como p16 e p21, impedindo que a célula entre em senescência (Ansieau *et al.*, 2008).

Outros fatores de transcrição como STAT3, quando fosforilados, podem ativar a expressão de proteínas inibidoras da apoptose, como Survivina, Mcl-1

e Bcl-xL no câncer de mama (Hsieh *et al.*, 2005; Sinibaldi *et al.*, 2001). A proteína Mcl-1 contribui para a sobrevivência de células tumorais e tem sido associada a células de mama com subtipo triplo-negativo, que apresentam características mesenquimais (Balko *et al.*, 2014). Entretanto, a partir da co-transfecção de células MCF-7 que passaram a superexpressar STAT3 e Mcl-1, foi demonstrado que a interação entre ambas promoveu atividade pró-apoptótica da proteína Mcl-1, quando essas células foram tratadas com hormônios esteroidais. Além disso, houve aumento da expressão de E-caderina e citoqueratinas e diminuição de N-caderina e Vimentina. O mesmo não foi observado quando a superexpressão de STAT3 e Mcl-1 se deu de forma isolada, onde verificou-se pronunciada invasão celular e aumento da expressão de MMP-2 em células MCF-7 (Renjini *et al.*, 2014).

A Survivina é comumente expressa em tecidos embrionários e pouco expressa em tecidos normais adultos (Garg *et al.*, 2016). Entretanto, em algumas células tumorais, a Survivina encontra-se superexpressa e está associada ao aumento de proliferação, por ativação da via de PI3K/AKT/WNT, e angiogênese, mediada por VEGF (Morinaga *et al.*, 2004; Tran *et al.*, 2002). Siddharth e colaboradores demonstraram que o silenciamento da Survivina em linhagens de câncer de mama MCF-7 e T47D reduziu a invasividade celular e inibiu a TEM induzindo a apoptose (Siddharth *et al.*, 2016). Foi também verificado que células MCF-7 silenciadas para c-IAP1 por siRNA ou com miméticos de Smac, apresentaram supressão da taxa migratória quando comparada com células MCF-7 que expressavam c-IAP1 selvagem, sugerindo um papel pró-migratório dessa proteína (Lopez *et al.*, 2011). A XIAP também apresenta um importante papel na regulação da migração celular. Kim e colaboradores demonstraram que a caveolina-1 pode ligar-se à XIAP através do domínio BIR3, formando um complexo XIAP-caveolina-1-integrina-5_a. Este complexo interage intracelularmente com FAK, uma quinase de adesão focal, e ativa ERK, culminando com a migração celular. Entretanto, com a inibição de XIAP o complexo fica incompleto e a migração não ocorre (Kim *et al.*, 2010).

Em outros modelos tumorais, a interrelação entre as proteínas que regulam a apoptose e a transição epitélio-mesênquima também já foi sugerida. Avaliando células de câncer de pâncreas, foi observado que a diminuição da

expressão de XIAP e Survivina resultou em aumento de expressão de E-caderina e diminuição de Slug (Yi *et al.*, 2015). A inibição simultânea de XIAP e Survivina resultou em aumento da expressão de PTEN e diminuição de pAKT, revertendo o fenótipo mesenquimal (Yi *et al.*, 2015). A via de sinalização PTEN/PI3K/AKT, regula a ativação de oncogenes induzida pela localização de AKT na membrana celular, desencadeando vias associadas à migração (Carnero *et al.*, 2008). Em células de câncer de colo retal, HCT116 foi demonstrado que a inibição de XIAP resulta na diminuição da migração celular que pode ser dependente do domínio RING. O domínio RING interage com Rho-GDI mediando a motilidade celular por regulação do citoesqueleto de actina (Liu *et al.*, 2011).

Os mecanismos que regulam a apoptose e a TEM apresentam-se intercorrelacionados, porém ainda precisam ser melhor elucidados. De fato, a desregulação da apoptose contribui para o fenótipo mesenquimal e resistente de uma célula levando a um potencial metastático e TEM. Desta forma, a compreensão de ambos os eventos é indispensável para melhor entender os efeitos biológicos observados em células tumorais de mama que apresentam diferentes fenótipos e respostas ao tratamento.

1.5 Novas estratégias para o tratamento *in vitro* de células tumorais de mama

1.5.1 Composto LQB-223

Diante do contexto da resistência a múltiplas drogas e da toxicidade associada ao tratamento quimioterápico, faz-se crucial desenvolver moléculas com ação antineoplásica mais eficiente e seletiva. Dessa forma, foi estabelecida uma colaboração com a equipe de pesquisadores do Laboratório de Química Bioorgânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro e da PUC-Rio (Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro), que realizam o planejamento e síntese orgânica de novos compostos com potencial antitumoral. Estes compostos vêm sendo testados em diversas linhagens neoplásicas; dentre leucemias e tumores sólidos, como por exemplo,

melanoma, apresentando atividade antineoplásica para tais modelos (Buarque *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2011; Nestal de Moraes *et al.*, 2014). Dentre esses compostos, o LQB-118, um híbrido derivado do lapachol e naftoquinonas (Netto *et al.*, 2010), apresentou toxicidade no tratamento das linhagens de leucemia mielóide crônica (LMC) K562 e a resistente à vincristina K562-Lucena (Maia *et al.*, 2011), bem como de células de leucemia mielóide aguda (LMA) derivadas de diferentes subtipos moleculares (de Souza Reis *et al.*, 2013; Nestal de Moraes *et al.*, 2014). Este composto também foi eficiente no tratamento *in vivo* de camundongos B16F10, reduzindo o crescimento do tumor de Ehrlich e melanoma, sem induzir toxicidade em linfócitos e células da medula óssea de camundongos Swiss (Nestal de Moraes *et al.*, 2014; Salustiano *et al.*, 2016). Desta forma, iniciamos a investigação dos efeitos do LQB-118 em células tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Entretanto, o tratamento para estas células não resultou em efeitos tóxicos, como analisado por ensaios de viabilidade celular e de indução de morte celular (dados não mostrados). Posteriormente, novos análogos do LQB-118 foram sintetizados, dando origem ao composto 11a-N-Tosil-5-deoxi-pterocarpano, LQB-223 (Figura 1.8) O LQB-223 tem demonstrado uma grande capacidade citotóxica para células leucêmicas FEPS e Lucena-1, que são derivadas da K562 e apresentam superexpressão dos genes *ABCB1*, (em ambas) e *ABCC1* (na FEPS) como mecanismos envolvidos na resistência (Buarque *et al.*, 2014). Ao serem tratadas com LQB-223, essas células apresentaram parada no ciclo celular na fase G2/M e fragmentação do DNA. O mesmo efeito foi observado em células de LMA resistentes à citarabina, que se mostraram bastante sensíveis ao tratamento *in vitro* com o composto LQB-223 (Hancio *et al.*, dados não publicados). Em glioblastomas, o tratamento com o LQB-223 resultou em uma resposta citotóxica superior à induzida pela temozolamida, tratamento padrão (Guimarães *et al.*, dados não publicados). Levando-se em consideração que os glioblastomas são tumores cerebrais com refratariedade à terapia vigente e os pacientes acometidos apresentam sobrevida média de 12 meses (Dresemann 2010), esses dados têm se mostrado promissores e estão sendo direcionados para modelos *in vivo* de xenoenxertos. Adicionalmente, o tratamento de esplenócitos de camundongos saudáveis Swiss com 10mM de LQB-223

resultou em baixa toxicidade, demonstrando um efeito seletivo para células tumorais deste composto (Buarque *et al.*, 2014).

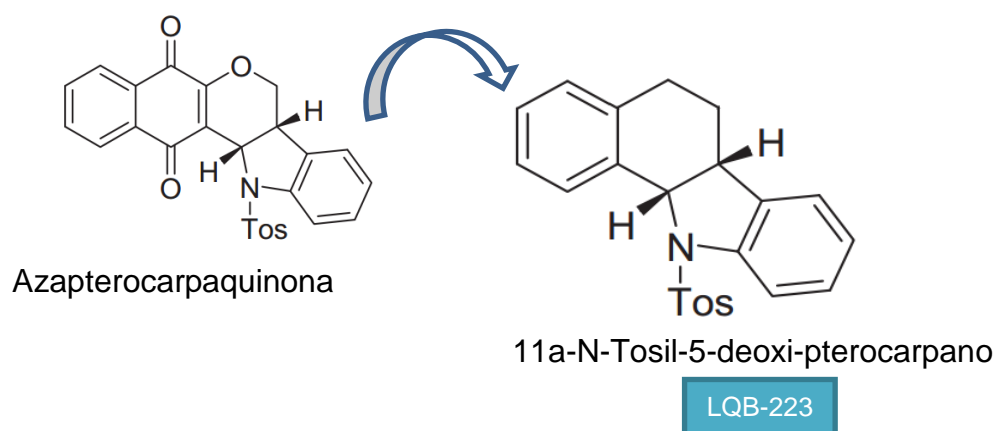


Figura 1.8: Estrutura molecular do composto LQB-223.

Além de eficiente no tratamento de células de tumores sólidos e hematológicos, o LQB-223 também se mostrou promissor no tratamento da malária. A avaliação *in vitro* de *P. falciparum* demonstrou que o LQB-223 liga-se de forma seletiva à Pftopoisomerase I deste parasita, que apresenta 42% de similaridade com a topoisomerase I humana (Reguera *et al.*, 2006). A topoisomerase é um potencial alvo para o tratamento da malária. Adicionalmente, experimentos *in vivo* demonstraram que o tratamento com o composto LQB-223, de camundongos infectados com *P. berghei*, mostrou atividade similar à cloroquina, fármaco indicado para profilaxia e tratamento da malária (Cortopassi *et al.*, 2014). De forma consistente, nosso grupo observou que o LQB-223 foi capaz de inibir a atividade da enzima topoisomerase α , agindo como um inibidor catalítico, sem intercalar no DNA. Neste trabalho foi também demonstrado que o LQB-223 inibe a viabilidade e induz parada no ciclo celular das células U937-R e CEM-R, linhagens de LMA e LLA respectivamente, que superexpressam Pgp e BCRP (Pereira *et al.*, manuscrito em preparo visando submissão).

Recentemente, foi demonstrado, através de técnicas envolvendo espectroscopia, que o LQB-223 interage com resíduos de DNA a partir de um processo hidrofóbico (Silva *et al.*, 2017). Essa interação não causa fragmentação do DNA, mas ocasiona alterações na molécula, apontando para

as primeiras evidências em relação ao mecanismo de ação primário do composto. A ligação de compostos bioativos ao DNA vem ganhando bastante atenção na literatura, visto que o DNA é um dos principais alvos do ponto de vista terapêutico em neoplasias (Silva *et al.*, 2017).

A atividade antitumoral do composto LQB-223 vem sendo atribuída ao grupamento Tosil da molécula química, visto que a sua substituição por um grupamento Mesil ou Benzoil levou a uma drástica redução do efeito citotóxico em células de leucemia (Buarque *et al.*, 2014). A inclusão do grupamento Tosil em outros compostos sintéticos derivados de Aza-carbapterocapano e 6,11-diidro-5H-benzo[a]cabazol foi eficiente em apresentar toxicidade seletiva em células MCF-7 e MDA-MB-231. A avaliação *in silico* desses compostos apresentou descritores para baixo ou ausente risco de toxicidade e valores comparáveis ao tratamento com daunorrubicina, quimioterápico utilizado para o tratamento da LMA (Mendes *et al.*, 2018). O conjunto desses dados nos questionou quanto à possível atividade antineoplásica de composto LQB-223 em células de câncer de mama, nos levando ao desenho inicial desse projeto.

1.5.2 Desenvolvimento de modelos com culturas tridimensionais *in vitro*

Para melhor compreender o efeito de novas estratégias terapêuticas no tratamento de células tumorais e estreitar as semelhanças entre experimentos *in vitro* e *in vivo*, o uso de novas tecnologias que mimetizam tumores sólidos é de grande relevância. O tratamento de células tumorais distribuídas em monocamada em garrafas de cultura de poliestireno é uma prática comum e pouco custosa para avaliação dos efeitos de novas drogas e vias de sinalização (Kim *et al.*, 2004). Esta prática, no entanto, apresenta limitações que desfavorecem uma avaliação mais aprofundada sobre a interação celular, comunicação entre as células e com a matriz extracelular (Ding *et al.*, 2018). Em conformação 2D, a distribuição dos nutrientes para as células ocorre de forma homogênea, o que não fornece semelhança fisiológica com o observado em tumores sólidos *in vivo* (Mehta *et al.*, 2012). Em contrapartida, o crescimento celular em conformação tridimensional confere uma maior semelhança com os tumores sólidos. Nessa conformação, a distribuição dos

nutrientes e das drogas utilizadas para o tratamento ocorre de forma diferenciada, dependendo da comunicação e difusão entre as células, o que confere uma maior resistência ao tratamento (Figura 1.8) (Kim *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2018). Como exemplo, células MCF-7 e BT474 em conformação tridimensional quando tratadas com Adriamicina e Paclitaxel apresentaram-se resistentes ao tratamento quando comparadas com células tratadas em monocamada (Imamura *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2018).

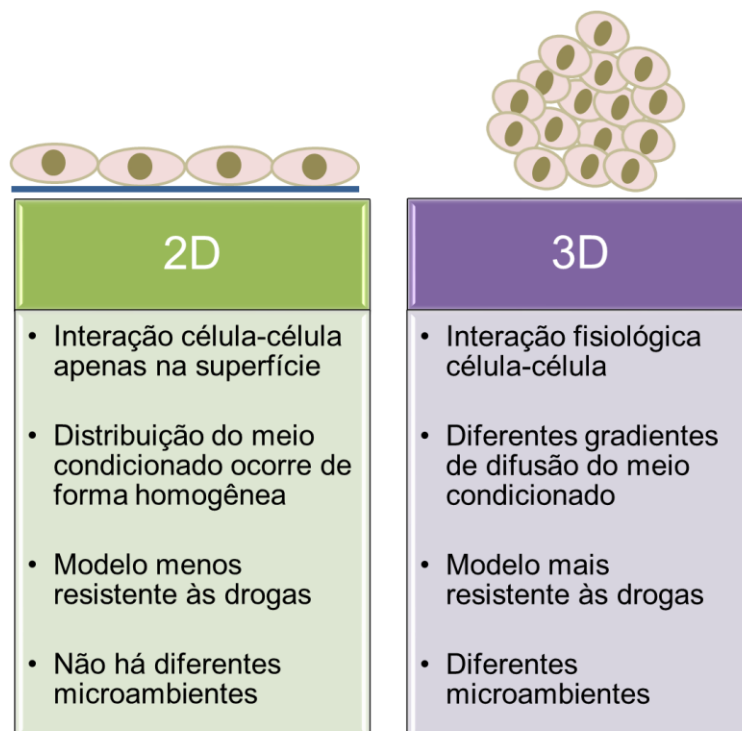


Figura 1.9: Quadro comparativo entre os modelos de cultura bi (2D) e tridimensional (3D).

Em culturas tridimensionais observa-se a formação de diferentes microambientes, visto que as células do centro do esferóide não recebem a mesma demanda de oxigênio e nutrientes que as células da superfície, podendo resultar em um centro hipóxico e necrótico (Mehta *et al.*, 2012). Tipicamente, é observado que enquanto as células da superfície dos esferóides estão em proliferação, as do centro encontram-se quiescentes (Lin & Chang, 2008). Células cultivadas em conformação 2D e 3D apresentam diferenças morfológicas e na expressão gênica. As respostas celulares ao ambiente hipóxico são reguladas pelo fator induzível por hipóxia (HIF), que ativa vias de sinalização que promovem a vascularização, proliferação e metástase (Schito

& Semenza, 2016; Zeng *et al.*, 2015). A hipóxia observada em esferóides de células tumorais de mama regulam importantes eventos associados à resistência (Wang *et al.*, 2018). Além de apresentarem um fenótipo mais resistente, células de mama em conformação 3D, MCF-7 e MDA-MB-231, passaram a expressar altos níveis do fator de transcrição Snail e elevados níveis de HIF-1, revelando que a hipóxia também contribui com um fenótipo mesenquimal (Kim *et al.*, 2014). Estes dados corroboram com achados anteriores que demonstraram que a hipóxia induziu a expressão RNAm de Snail em células de câncer de ovário (Imai *et al.*, 2003)

Foi também observado que células BT474 e MCF-7 em conformação tridimensional passaram a expressar altos níveis de Pgp devido à ativação do HIF-1, que promove a regulação transcricional do gene *MDR-1*. Devido a isto, o tratamento da cultura tridimensional de MCF-7 apresentou menor acúmulo de doxorubicina intracelular e, conseqüentemente, mostrou-se mais resistente ao tratamento (Breslin & O'Driscoll, 2016; Doublie *et al.*, 2012). Células BT474 em cultura 3D passaram a expressar altos níveis de AKT, pAKT, ERK e receptores da família EGFR, proteínas associadas à sobrevivência (Breslin & O'Driscoll, 2016).

De acordo com as características celulares e morfológicas e a metodologia utilizada, as culturas tridimensionais podem ser classificadas em diferentes nomenclaturas. Froehlich e colaboradores classificaram as culturas 3D quanto ao grau de compactação em: esferóides, múltiplos pequenos esferóides, agregado compacto, agregado frouxo e células singulares em suspensão (Figura 1.9) (Froehlich *et al.*, 2016). De acordo com seus achados, a técnica de sobreposição líquida, que consiste em adicionar células a uma placa de 96 poços com fundo não aderente, favorecendo a formação de estruturas tridimensionais por adesão intracelular, é um eficiente método para o estabelecimento de esferóides de células MCF-7 e agregados compactos de MDA-MB-231 (Froehlich *et al.*, 2016). A eficiência da técnica ainda depende do tipo de fundo do poço e da marca da placa utilizada. Essa classificação nos auxilia a identificar as culturas, nomear corretamente e entender as características intercelulares. Uma vez estabelecidas, as culturas tridimensionais, podem ser submetidas à avaliação de diversos parâmetros,

utilizando metodologias conhecidas como: ensaios de viabilidade, RT-PCR, imunohistoquímica, imunofluorescência, *Western blotting*, ensaios de migração e co-culturas heterogêneas para avaliar toxicidade de drogas. A interação célula-célula, os diferentes microambientes e a resistência inerente aos modelos tridimensionais, permitem uma melhor transposição e similaridade dos resultados encontrados *in vitro* para a realidade *in vivo*. Isto encoraja a continuidade dos estudos com modelos *in vivo*, que demandam mais recursos, apoio científico e questões éticas.

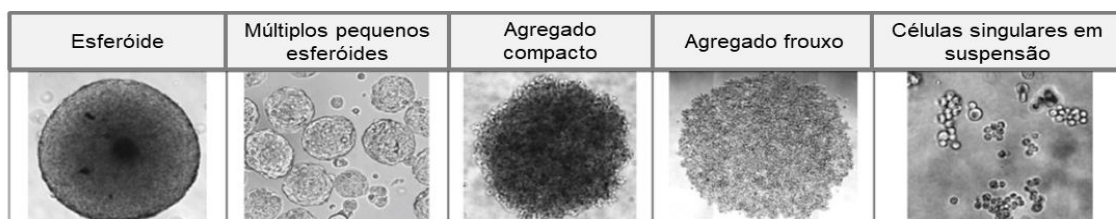


Figura 1.10: Classificação das estruturas celulares 3D de acordo com a morfologia dos agregados. Adaptado de Froehlich *et al.*, 2016.

1.6 Justificativa para o estudo

No Brasil, as taxas de mortalidade do câncer de mama são bastante elevadas, muito provavelmente porque as pacientes são diagnosticadas em estágios avançados da doença (INCA, 2018). O tratamento padrão para esta neoplasia baseia-se na utilização de antraciclinas associadas aos taxanos ou à ciclofosfamida e fluorouracil (Burnell *et al.*, 2010). Apesar de serem apropriados para o tratamento do câncer de mama, e a despeito dos crescentes avanços terapêuticos, ainda se faz necessário o aumento das taxas de sobrevivência global em pacientes com câncer de mama. Devido à heterogeneidade da doença, que pode ser subdividida histologicamente em 4 subtipos, Luminal A, Luminal B, Her-2 e triplo-negativo, não há aplicabilidade de um protocolo único. Dentre os subtipos de câncer de mama, o triplo-negativo acomete cerca de 15% dos casos e está associado à maior agressividade, comprometimento de linfonodos e menor sobrevivência global (Sharma, 2016). Ademais, a ausência de receptores hormonais e Her2 resulta na utilização de protocolos terapêuticos sem direcionamento molecular e assim, baseados apenas na quimioterapia. Este panorama desfavorável se agrava, principalmente, com o desenvolvimento de

resistência a múltiplas drogas, caracterizada por inúmeros e distintos mecanismos moleculares. Este fator tem sido apontado como responsável pela ineficiência da quimioterapia em cerca de 80 a 90% de pacientes com câncer de mama metastático (Longley & Johnson, 2005; Cherdyntseva *et al.*, 2017). A quimiorresistência no câncer de mama está associada, dentre vários fatores, à superexpressão de proteínas como XIAP, Survivina, FOXM1 e Mcl-1 (Nestal de Moraes *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2016).

Ademais, o tratamento com DOX e DTX tem sido associado ao aumento de efeitos colaterais para as pacientes, sendo principalmente evidenciado por toxicidade cardíaca e hematológica. Neste contexto, a investigação de novos compostos com a finalidade de sobrepujar os mecanismos de resistência, agindo de forma eficiente também para os subtipos mais agressivos, bem como, apresentando menor toxicidade para células não neoplásicas é de extrema importância.

O composto LQB-223, 11a-N-Tosil-5-deoxi-pterocarpano, vem sendo estudado pelo nosso grupo, devido a sua capacidade citotóxica demonstrada em células tumorais com diferentes fenótipos de resistência a drogas, como células leucêmicas FEPS e Lucena-1. Adicionalmente, o tratamento de esplenócitos de camundongos Swiss com LQB-223 resultou em baixa toxicidade, demonstrando um efeito seletivo para células tumorais (Buarque *et al.*, 2014). Dados preliminares demonstraram que o tratamento baseado no composto LQB-223 de células de LMA resistentes à citarabina e células de glioblastoma apresentou efeito citotóxico, sobrepujando os mecanismos de resistência associados a essas células. Desta forma, justifica-se o estudo do LQB-223 como um promissor composto para o tratamento de células tumorais de mama, a fim de compreender os seus efeitos e contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento e bem-estar de pacientes acometidas com essa neoplasia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos antitumorais do composto sintético LQB-223 em células de câncer de mama.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Avaliar os efeitos citotóxicos do composto LQB-223 em células derivadas de câncer de mama apresentando diferentes subtipos moleculares;
- ❖ Avaliar os efeitos citotóxicos do composto LQB-223 em células não neoplásicas de mama;
- ❖ Identificar os efeitos do composto LQB-223 na distribuição do ciclo celular e na modulação da expressão de proteínas relacionadas;
- ❖ Verificar se o composto LQB-223 induz morte celular mediado por apoptose nas células de câncer de mama;
- ❖ Avaliar a modulação das proteínas associadas à resistência às drogas como potenciais alvos para o tratamento com o composto LQB-223;
- ❖ Avaliar a taxa migratória e a motilidade celular das células de câncer de mama mediante o tratamento com o composto LQB-223;
- ❖ Identificar os efeitos do composto LQB-223 na viabilidade celular das culturas de câncer de mama em conformação 3D;
- ❖ Verificar os efeitos do composto LQB-223 na migração celular das culturas câncer de mama em conformação 3D.

3. Material e Métodos

3.1 Cultura de células

A metodologia empregada para investigar os efeitos do LQB-223 em células de mama tem como base a utilização de três linhagens: MCF-7, MDA-MB-231 e HB4a. A linhagem MCF-7 é derivada de carcinoma de mama ductal invasivo, e apresenta o gene *TP53* selvagem, com expressão dos receptores de estrógeno e progesterona e níveis basais do receptor epidermal Her2/neu (Katayose *et al.*, 1995; Nagaraja *et al.*, 2006). A linhagem MDA-MB-231, também derivada de carcinoma de mama ductal invasivo, quando comparada com a linhagem MCF-7, apresenta um fenótipo mais agressivo e menos responsivo às drogas utilizadas no tratamento do câncer de mama (Katayose *et al.*, 1995; Nagaraja *et al.*, 2006). Em parte, essas características podem ser atribuídas à presença de mutação no gene *TP53* e ausência de receptores de estrógeno, progesterona e Her2/neu. De acordo com a classificação imunohistoquímica utilizada na clínica, essas linhagens correspondem a diferentes subtipos, sendo a MCF-7 classificada como Luminal, enquanto que a MDA-MB-231 como triplo-negativa. Além das células tumorais, a linhagem HB4a foi utilizada para verificar a toxicidade do composto LQB-223 em células não neoplásicas de mama. A HB4a é originada de células epiteliais luminiais de mama e imortalizada usando um vetor retroviral anfotrófico para transduzir o recombinante tsA58-U19 do mutante SV40 do gene do antígeno T. Esta linhagem apresenta fenótipo negativo para os receptores hormonais de estrógeno e progesterona, e níveis basais do receptor Her2 (Stamps *et al.*, 1994; Trapé *et al.*, 2012).

As linhagens foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Gibco; BRL, UK), suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB (Gibco) com adição de penicilina e estreptamicina na concentração de 1 µL/mL. A linhagem HB4a foi também suplementada com hidrocortisona e insulina a 5 µM. As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% CO₂. As linhagens foram genotipadas de acordo com os seus perfis STR (*Short*

Tandem Repeats) e monitoradas periodicamente quanto à infecção por micoplasma.

3.2 Agentes citotóxicos utilizados no tratamento das linhagens celulares

O principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do composto 11a-N-Tosil-5-deoxi-pterocarpano, LQB-223, em células de câncer de mama de diferentes subtipos. O composto LQB-223 foi cedido e sintetizado em colaboração com o Laboratório de Química Bioorgânica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e Departamento de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RIO), como descrito por Buarque *et al.* 2014. Para uso, o composto foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), e testado nas concentrações de 1, 2.5, 5, 10, 15 e 20 μM . Como controle, o DMSO foi utilizado em concentrações equivalentes ao composto.

Para compreender se o LQB-223 apresenta citotoxicidade semelhante ou superior ao tratamento usual, parte dos experimentos também foi realizada em comparação com os quimioterápicos DTX (Docelibbs[®], Libbs) e DOX (Rubidox, Bergamo). As drogas foram mantidas à temperatura de -20°C e utilizadas nas respectivas concentrações 100 nM e 1 μM (Gewirtz, 1999; Hernandez-Vargas *et al.*, 2007).

3.3 Análise das alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com os compostos LQB-223, DTX e DOX.

Para avaliar possíveis variações morfológicas, as células foram tratadas com LQB-223, DTX e DOX por 24, 48 e 72 horas. Ao final de cada tempo, as células foram observadas e fotografadas por um microscópio ótico invertido (Axio Observer.Z1, Zeiss) com magnificação de 10 x. As imagens são representativas de três experimentos independentes.

3.4 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de MTT

O ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), descrito por Mosmann em 1983, consiste em quantificar as células

metabolicamente ativas que estão aptas a incorporar o sal de MTT, reduzindo-o a cristais de formazan, que apresentam a coloração azul. Com esse ensaio, é possível inferir se o tratamento com os diferentes compostos do estudo induzem citotoxicidade celular.

Para avaliar esse efeito, um total de 10^4 células foram cultivadas em placas de 96 poços. Após 24 horas, tempo necessário para a adesão celular, as células foram tratadas com LQB-223 nas concentrações de 1, 2.5, 5, 10, 15 e 20 μM . A DOX foi utilizada na concentração de 1 μM e o DTX, 100 nM. Os tempos de exposição a essas drogas foram de 24, 48 e 72 h e, posteriormente, as células foram submetidas ao ensaio de MTT.

Para mensurar a atividade metabólica celular, uma solução contendo o MTT 5mg/mL foi adicionada a cada poço e após 3 horas de incubação em estufa de CO_2 a 37°C , os cristais de formazan formados pelas células foram dissolvidos em DMSO. A placa foi lida em leitor de microplaca (EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom) no comprimento de onda de 492 nm. As concentrações e os experimentos foram feitos em triplicata, e a estatística foi realizada considerando o desvio padrão da média de cada experimento independente e o valor de p maior ou igual a 0,05. Os valores relativos das medidas da absorbância foram normalizados com o controle experimental de cada condição.

3.5 Ensaio de Formação de Colônias

O ensaio de formação de colônias, também conhecido como ensaio clonogênico. O corante cristal violeta foi utilizado para corar as colônias formadas. Esse corante tem afinidade por ácidos nucleicos, corando as células tornando possível estimar o crescimento celular.

Para o experimento, um total de 2×10^3 células foram cultivadas em placas de seis poços e após a aderência, as células foram submetidas ao tratamento com LQB-223, DTX ou DOX por 24 h. Após esse intervalo, os compostos foram removidos e à cultura foi adicionado meio de cultura livre de droga. A formação das colônias foi observada até o 14^o dia quando então, foram lavadas com PBS (solução salina de fosfato), fixadas em etanol absoluto

e coradas com cristal violeta a 0,5%. Após a coloração, as colônias foram lavadas com água e mantidas em temperatura ambiente para secagem dos poços. Por fim, os cristais foram dissolvidos em ácido acético glacial a 33% e o conteúdo mensurado em densidade óptica de 595 nm em leitor de placa (EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom). Os valores relativos das medidas da absorbância foram normalizados com o controle experimental de cada condição.

3.6 Identificação da morte celular por marcação de Anexina V/PI

A fosfatidilseria (FS) presente na face interna da membrana plasmática, quando exposta ao espaço extracelular caracteriza um dos eventos da apoptose. A Anexina V tem afinidade pela FS, portanto células marcadas com Anexina V podem ser classificadas nos estágios iniciais da apoptose (Crowley *et al.*, 2016) Em contrapartida, o Iodeto de Propídeo (PI) é um intercalante de DNA utilizado como um marcador de morte celular tardia e necrose (Crowley *et al.*, 2016). O PI apresenta um elevado peso molecular e, conseqüentemente, intercala-se ao DNA somente quando a membrana plasmática está comprometida e permeável (Rieger *et al.*, 2011). A marcação das células com Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI) permite identificar diferentes tipos de morte celular. Para a marcação, as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com LQB-223, DTX ou DOX durante 24, 48 e 72 horas. Posteriormente, as células foram submetidas à tripsinização e mantidas em PBS/BSA (albumina bovina sérica) a 2% por 30 minutos para restabelecimento da membrana plasmática. Após a centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos, as células foram incubadas com 5 µg/ml de Anexina V – Alexa Fluor 488 (Life Technologies; Carlsbad, California, EUA) e tampão de ligação por 15 minutos. Após esse tempo, foi acrescida uma solução de PI (50 µg/ml PI diluído em tampão citrato 4mM e 0,3% Triton X-100) na concentração final de 5 µg/mL. A fluorescência emitida a partir da Anexina V e PI foi capturada pelo citômetro CyAn ADP (Beckman Coulter Inc; Brea, CA, US). O software Summit v4.3 (Fullerton, CA, US) foi utilizado para análise dos dados.

3.7 Análise da distribuição do ciclo celular por quantificação do conteúdo de DNA

Para analisar a distribuição das fases do ciclo celular nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, foi realizada a quantificação do conteúdo de DNA. Para tal, um total de 5×10^5 células foram tratadas com LQB-223, DTX e DOX por 24, 48 e 72 h, tripsinizadas e lavadas com PBS. Posteriormente, foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos e ao pellet formado, foram adicionados 500 μ L de RNase (ribonuclease A 100 μ g/mL diluída em tampão citrato 40 mM) e 500 μ L da solução de PI. A aquisição das amostras foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o citômetro CyAn ADP (Beckman Coulter Inc; Brea, CA, US) e a análise dos dados foi realizada pelo software Summit v4.3 (Fullerton, CA, US).

3.8 Detecção da expressão de proteínas por *Western blotting*

Para confirmar os resultados obtidos no ensaio de morte celular por marcação de Anexina V/PI, foram avaliados os níveis proteicos das pró-caspases -3, -7 e -9, proteínas envolvidas na cascata apoptótica (Kadam & Abhang, 2016). Além disso, com o intuito de identificar possíveis alvos moleculares para o LQB-223, foi avaliada a expressão das proteínas p53, p21^{Cip1}, XIAP, Survivina, c-IAP1, c-IAP2, Smac/DIABLO, MCL-1, Bcl-2, FOXM1 e topoisomerasas II alfa e II beta. As células foram submetidas ao tratamento com LQB-223 durante 0, 8, 24 e 48 horas para a melhor compreensão da modulação dessas proteínas. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e lavadas com PBS, para obtenção dos pellets. Para a extração das proteínas, foi utilizado o Tampão de Extração Celular Invitrogen (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, US) e a quantificação das proteínas foi realizada com o kit Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, US), baseado no método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). As amostras foram preparadas utilizando tampão de amostra (115 mM Tris-HCl em pH 6.8; 15% SDS; 10% de glicerol; 100 mM de 2- β -mercaptoetanol; 0,1% de azul de bromofenol) de forma que ficassem na concentração final de 1 μ g/ μ L. Um total de 30 μ g de proteína foi aplicado no

gel para posterior corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE). (do inglês, *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). O gel de empilhamento apresenta uma trama mais frouxa, com 5% de acrilamida e auxilia o nivelamento das amostras. O gel de resolução auxilia na separação das proteínas, e apresentou porcentagem de 7, 10 ou 12% de acrilamida, dependendo do peso molecular da proteína de interesse. A corrida foi realizada por 1 h a 200 V e as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, US) durante 2 h a 100 V. A membrana foi bloqueada por 2 h com uma solução a 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-Tween (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 150mM de NaCl; 0,2% Tween-20) e incubada a 4°C *overnight* com os anticorpos primários (Tabela 3.1). Os anticorpos secundários anti-mouse (1:40000) (GE Healthcare®), anti-rabbit (1:40000) (GE Healthcare®), e anti-goat (1:2000), por sua vez, foram mantidos em temperatura ambiente por 1 h sob agitação. Para a revelação das proteínas, foi utilizado o kit ECL (GE Healthcare Life Technologies, Buckinghamshire, Eng) ou Clarity Max™ (Western ECL Substrate – BioRad Laboratories, Hercules, CA, US), e a detecção da quimioluminescência foi feita pelo c-Digit (Li-cor Biociences, Lincoln, Nebraska, USA). Os anticorpos Hsc70 e β -actina foram utilizados como controle constitutivo.

Tabela 3.1: Anticorpos primários utilizados na técnica *Western blotting*

Anticorpo primário	Peso molecular	Número catálogo	Marca	Diluição em TBS/BSA 2%	Isotipo
FOXM1	110 kDa	sc-502	Santa Cruz	1:500	Rabbit
XIAP (3B6)	53 kDa	2045S	Cell Signaling	1:1000	Rabbit
c-IAP 1	64 kDa	AF8181	R&D Systems	1:2000	Goat
c-IAP 2	68 kDa	AF8171	R&D Systems	1:2000	Goat
Mcl-1	40 kDa	#4572	Cell Signaling	1:1000	Rabbit
Survivina	16 kDa	2808S	Cell Signaling	1:1000	Rabbit
Bcl-2	26 KDa	M0887	DakoCytomation Denmark A/S	1:1000	Mouse
p53	53 kDa	M7001	DakoCytomation Denmark A/S	1:500	Rabbit
Smac/DIABLO	22kDa	S0941	Sigma Aldrich	1:500	Rabbit
p21	21 kDa	#2946	Cell Signaling	1:1000	Mouse
Pró-caspase-3	32 kDa	610322	BD Biosciences	1:1000	Mouse
Pró-caspase-7	38 kDa	MAB823	R&D Systems	1:1000	Mouse
Pró-caspase-9	46 kDa	MAB8301	R&D Systems	1:1000	Mouse
Hsc70	70 kDa	sc-7298	Santa Cruz	1:1000	Mouse
β-actina	42 kDa	A2228	Sigma Aldrich	1:1000	Mouse

3.9 Avaliação da migração celular pelo ensaio de *wound-healing*

As alterações na migração celular induzidas pelo composto LQB-223 em células neoplásicas de mama foram avaliadas pelo ensaio de *wound-healing*. Esse ensaio permite avaliar a taxa de migração das células a partir de um risco artificial em uma monocamada confluyente. Dessa forma, é possível acompanhar o padrão de migração das células das extremidades em direção ao espaço vazio.

Para execução do ensaio, 3×10^5 células foram cultivadas em placas de seis poços e mantidas em estufa úmida de CO₂ a 37°C por 24 h para adesão à placa. Após esse período, o meio de cultura com 10% de SFB foi trocado por outro contendo 0,1% de SFB. A utilização de um meio de cultura suplementado com menor concentração de SFB teve por objetivo reduzir a taxa proliferativa das células. Após 24 h, as feridas foram realizadas com o auxílio de uma ponteira de 10 µL. Em cada poço, foram feitas três feridas em diferentes locais, o que permitiu a medição de nove pontos de migração na mesma condição experimental. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e o meio de cultura com 0,1% de soro, contendo ou não o composto LQB-223, foi adicionado à placa. As placas foram imediatamente fotografadas para que fosse registrado o ponto inicial da migração (tempo 0 h). As células foram mantidas por 24 h em estufa úmida de CO₂ e foram novamente fotografadas. As imagens obtidas foram utilizadas para avaliar quantitativamente a distância entre as células e conseqüentemente, a sua taxa de migração. As células foram observadas e fotografadas em um microscópio ótico invertido (Axio Observer.Z1, Zeiss) com magnificação de 10x.

A taxa de migração foi calculada a partir de uma razão entre a área da borda da ferida (área que continha células) no tempo 24 h e a área encontrada em 0 h. Esta razão permitiu mensurar o espaço que fora ocupado pelas células no intervalo de 24 h e, portanto, estimar a taxa de migração. As medidas referentes à distância entre as células nas extremidades opostas foram obtidas através do software ImageJ (NIH - ImageJ 1.49v, Madison, WI, USA).

3.10 Avaliação da proliferação com cristal violeta

Como controle experimental do ensaio *wound-healing*, foi realizada a monitoração da proliferação celular com meio de cultura contendo 0,1% SFB. Para isso, foram cultivadas 10^4 células em cada poço da placa de 96 poços. Para comparação, as células foram mantidas em dois grupos de tratamento, um contendo 0,1% de SFB e outro, 10% de SFB.

Após o plaqueamento e adesão, foi feito o tratamento com o LQB-223, DTX e DOX. As placas foram fixadas com etanol absoluto e coradas com cristal

violeta a 0,05% nos tempo de 0 h (imediatamente após a adesão), 24 e 48 h após tratamento com o LQB-223. Após a secagem, o corante foi dissolvido em metanol absoluto. A absorbância foi obtida no comprimento de onda 595 nm em leitor de placa (EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom).

3.11 Quantificação da motilidade celular pelo ensaio fagocinético de ouro coloidal

A motilidade celular avaliada pelo ensaio fagocinético de ouro coloidal, permite mensurar a movimentação de uma única célula. A movimentação celular é avaliada à medida que as células fagocitam as nanopartículas de ouro precipitadas no fundo da placa, dando origem a um rastro, que pode ter a sua área quantificada. Para a realização do ensaio, uma placa de 24 poços contendo 300 μ L de BSA a 1%. foi incubada na estufa de CO₂ a 37°C por 3 h. Após a incubação, os poços foram lavados com etanol absoluto e 300 μ L de uma solução de ouro coloidal foi adicionada. A solução de ouro coloidal foi preparada adicionando-se 3,85 mL de H₂O estéril, 630 μ L de 14,5 mM AuHCl₄ e 2,1 mL de 36,5 mM Na₂CO₃ e levada ao banho-maria a 100°C por 5 minutos ou até ferver. Após a fervura, foram adicionados 630 μ L de 0,1 % formaldeído. A adição do formaldeído promove a precipitação das nanopartículas de ouro, formando um tapete uniforme nos poços após o plaqueamento. A placa contendo a solução de ouro foi mantida na estufa de CO₂ a 37°C por 24 h. Em seguida, foram plaqueadas 2×10^3 células por poço com meio de cultura contendo 10% de SFB. Após a adesão, foi adicionado o meio de cultura contendo 0,1% de SFB para evitar a proliferação e as células foram tratadas com 20 μ M DMSO, 5 e 20 μ M LQB-223 e 1 μ M de DOX. Após o tratamento, as células foram mantidas por 20 h na estufa de CO₂ a 37°C, para posteriormente serem fotografadas e terem o rasto quantificado. Os rastros foram fotografados no microscópio ótico (Nikon Eclipse TS100) e câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio (Digital Sight DS-2 Mv, Nikon) e quantificados por auxílio do software ImageJ (NIH). Um total de 20 rastros, por condição experimental, foram escolhidos aleatoriamente para a quantificação e as medianas das medidas foram plotadas em gráfico de dispersão.

3.12 Formação de culturas celulares em conformação 3D

Evidências recentes sugerem que culturas celulares 3D são os mais eficientes métodos *in vitro* para avaliação de toxicidade de drogas, pois se apresentam na interface de complexidade entre cultura em monocamada e experimentos *in vivo* (Friedrich *et al.*, 2009, Mazzoleni *et al.*, 2009). Os modelos tridimensionais apresentam protocolos econômicos para estudos pré-clínicos de desenvolvimento de novos compostos visando o tratamento de tumores sólidos. Permite ainda mensurar o efeito de compostos sobre a proliferação, migração, invasão e angiogênese tumoral (Friedrich *et al.*, 2007, Vinci *et al.*, 2012). Assim, o desenvolvimento de culturas 3D utilizando as linhagens do estudo foi de grande importância para a compreensão do efeito citotóxico do LQB-223 na conformação tridimensional, tal qual um tumor sólido.

Para a obtenção dessas culturas celulares, uma solução contendo 1,5% de agarose diluída em água foi utilizada para cobrir os poços da placa de 96 poços. A agarose apresenta componentes que não permitem aderência das células ao substrato, favorecendo a interação célula-célula, originando um agregado celular ou esferóide. Para a obtenção de estruturas 3D com diâmetro variando entre 300 e 500 μM , como preconizado na literatura (Froehlich *et al.*, 2016), foram plaqueadas 2000 e 6000 células por poço para as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente. As placas foram submetidas à centrifugação a 2000 rpm por 5 min e as células foram mantidas por 72 h em estufa úmida de CO_2 a 37°C , tempo estabelecido para a formação dos agregados celulares. Posteriormente, as estruturas tridimensionais foram tratadas com LQB-223 nas concentrações de 5 e 20, μM e DOX a 1 μM por 9 dias, com troca parcial do meio de cultura contendo o tratamento no quinto dia (Figura 3.1). No quinto dia, 100 μL do meio de cultura (metade do volume inicial) foi descartada e a mesma quantidade foi adicionada a cada poço contendo a metade da concentração do tratamento inicial. A morfologia das culturas 3D foi periodicamente avaliada utilizando microscópio ótico (Nikon Eclipse TS100) e câmera fotográfica digital acoplada (Digital Sight DS-2 Mv, Nikon). Os registros foram realizados nos dias 0, 1, 5 e 9 após o tratamento

com o LQB-223 e DOX e as condições de tratamento foram realizadas em oito réplicas.

3.13 Avaliação do volume de culturas celulares em conformação 3D

Para avaliar quantitativamente o crescimento das culturas após o tratamento com LQB-223, foi medido o volume das culturas a partir das imagens obtidas nos dias 0, 1, 5 e 9 (Figura 3.1). Com auxílio do software ImageJ (NIH) o valor referente ao volume dos esferóides foi obtido a partir da fórmula: $\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3$. Para obtenção do valor relativo do volume dos esferóides em cada condição, foram utilizadas 8 replicatas. A avaliação do crescimento dos esferóides foi obtida por uma razão entre os dias de tratamento e o dia 0. O resultado final foi expresso em valores relativos de pixels encontrados em cada imagem.

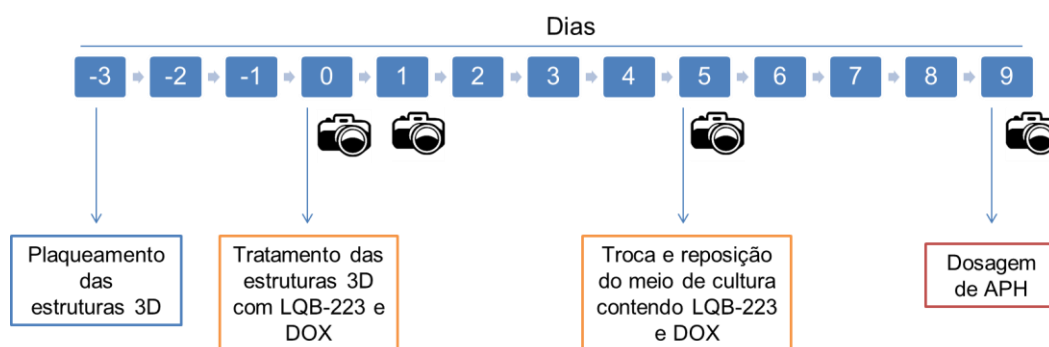


Figura 3.1: Desenho experimental representando a avaliação da viabilidade e volume das culturas celulares em conformação 3D mediante o tratamento com o LQB-223 ao longo dos dias. O plaqueamento das células em agarose foi realizado 72 h (dia -3) antes do tratamento das estruturas com o composto LQB-223 e doxorrubicina (DOX) (dia 0). Nos dias 0, 1, 5 e 9, foram obtidas imagens fotográficas para avaliação do crescimento das culturas. Após 9 dias de tratamento com o LQB-223 (dia 9), foi feita a dosagem da fosfatase ácida (APH) para avaliação da viabilidade das estruturas tridimensionais.

3.14 Avaliação de viabilidade celular em cultura 3D através da dosagem da enzima fosfatase ácida (APH)

O ensaio da fosfatase ácida (APH) foi utilizado para avaliar a viabilidade celular em culturas 3D após o tratamento com os compostos. A APH pertence a um grupo de isoenzimas intracelulares que estão ativas em pH entre 4,5 e 7, e catalisam a hidrólise do éster (p-nitrofenil) em álcool (p-nitrofenol) (Figura 3.2)

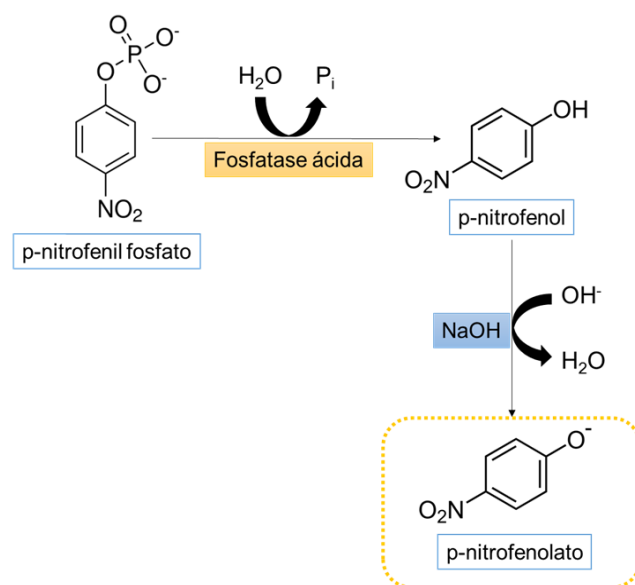


Figura 3.2: Atividade da fosfatase ácida na conversão de p-nitrofenil fosfato em p-nitrofenol. A catálise ocorre em pH 4,8 e após adição de NaOH, a reação é cessada e um composto de coloração amarelada (p-nitrofenolato) é formado.

Para realizar este teste, as células foram plaqueadas e mantidas em cultura por três dias para formação das estruturas tridimensionais. No dia 0 (Figura 3.1), as células foram tratadas com LQB-223 e DOX e mantidas em tratamento por nove dias para avaliação da atividade de APH (Figura 3.2).

Para dosagem do APH, os esferóides foram transferidos para uma placa de 96 poços sem agarose e centrifugados a 2000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi desprezado e os esferóides lavados com PBS. A lavagem foi repetida e em seguida, foram adicionados 100 μL de PBS e 100 μL de uma solução contendo 0,1 M acetato de sódio e 0,1% Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e fosfato de 4-nitrofenila (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), na concentração de 2 mg/mL em pH 4,8. A placa foi mantida ao abrigo da luz durante 1,5 h na estufa de CO_2 a 37°C , previamente à adição de 10 μL de 1 N NaOH aos poços. A adição da base, além de interromper a

reação, permite que o radical hidroxila (OH) se ligue ao p-nitrofenil, formando um composto (p-nitrofenolato) de coloração amarela, que pode ser capturada a 405 nm em leitora de placa (EZ Read 400 Microplate Reader – Biochrom).

3.15 Avaliação da migração de culturas celulares em conformação 3D pelo método de migração em gelatina

Para avaliação da migração das células em conformação tridimensional, foram adicionados 300 µL de gelatina de pele de porco (Sigma-Aldrich) 0,1% diluída em água a uma placa de 24 poços. A placa foi mantida na estufa de CO₂ a 37°C por 45 minutos, permitindo a formação de uma película fina de gelatina. Após este tempo, o excesso de gelatina foi removido e as estruturas tridimensionais, pré-formadas (conforme descrito no Item 3.13), foram adicionadas a cada poço. Após o tratamento com DMSO, LQB-223 ou DOX, o perfil de migração foi acompanhado durante 24, 48 e 72 horas. Os experimentos foram realizados com meio de cultura contendo 2% de SFB para minimizar os efeitos de proliferação celular. À medida que as células migram na gelatina, um halo de células espalhadas e aderidas à gelatina é formado, cuja área pode ser medida por ferramentas de imagem. Para a quantificação da migração, o registro fotográfico foi feito nos tempos estabelecidos utilizando microscópio ótico (Nikon Eclipse TS100) e câmera fotográfica digital acoplada (Digital Sight DS-2 Mv, Nikon). A análise das medidas dos halos foi realizada utilizando o software ImageJ (NIH) e a taxa de migração foi calculada por uma razão entre 24 h / 0h e 48 h / 0 h.

3.16 Análises estatísticas

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Para comparar a diferença entre as médias de grupos, utilizamos o teste T Student's ou One-way ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni para avaliação das médias, e Teste Wilcoxon para medianas. Foi considerado um intervalo de confiança de 95% e valor de $p < 0.05$ estatisticamente significativo.

4. Desenho Experimental

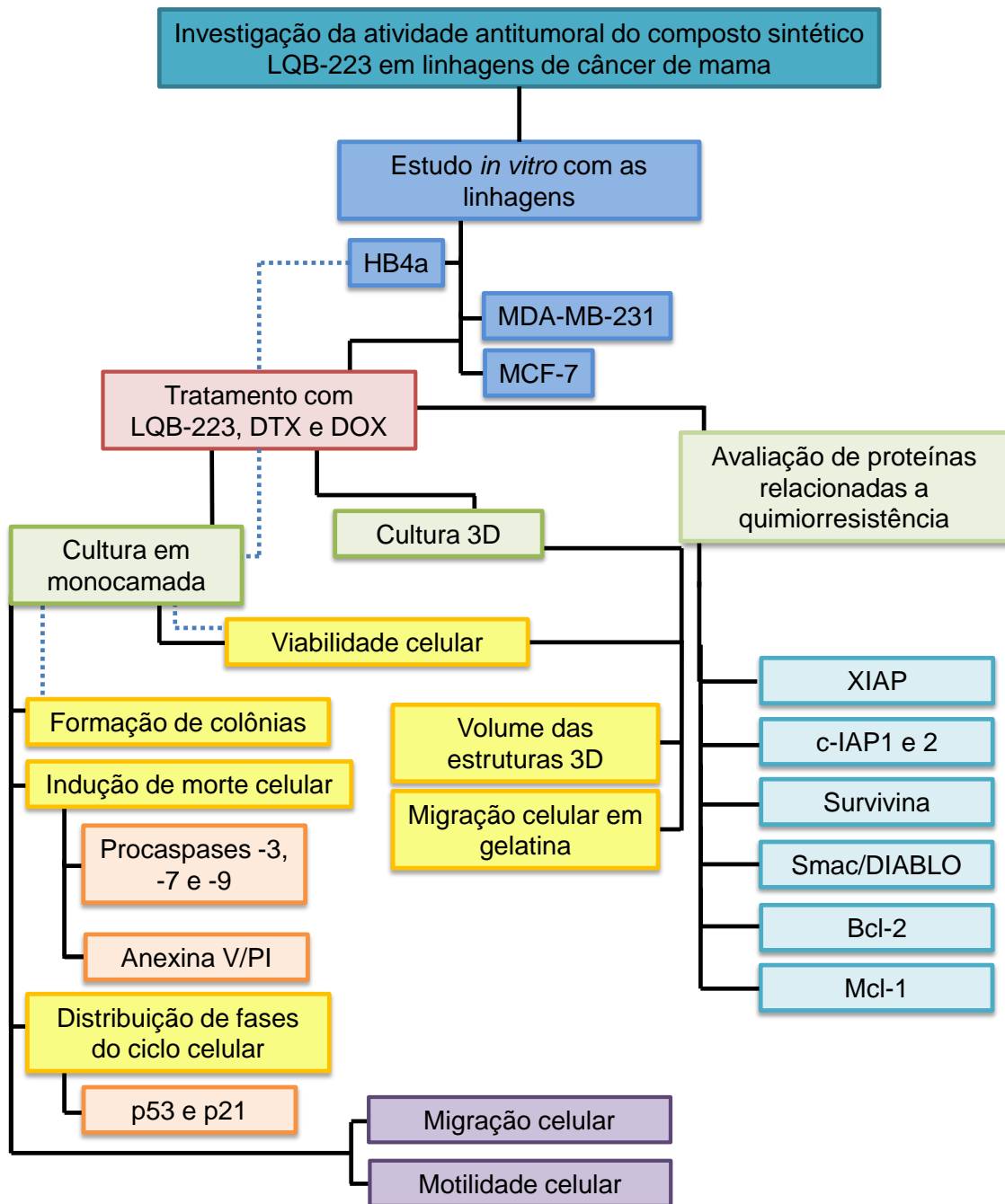


Figura 4.1: Fluxograma ilustrando o desenho experimental do estudo.

5. Resultados

5.1 O composto LQB-223 possui efeito citotóxico para as células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231.

Apesar de eficiente no tratamento do câncer de mama, os quimioterápicos DTX e DOX apresentam importantes efeitos tóxicos para as pacientes (Murtagh *et al.*, 2016; Panis *et al.*, 2011). Ademais, a resistência a múltiplas drogas representa um importante aspecto para a ineficiência do tratamento (Wang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). Desta forma, novos compostos com a finalidade de sobrepujar os mecanismos de resistência, bem como induzir toxicidade para células tumorais apresentando baixa toxicidade para células não neoplásicas têm se tornado interessantes alvos de estudos, visando melhorar a qualidade de vida das pacientes em tratamento quimioterápico. Neste contexto, nosso laboratório vem estudando promissores compostos sintéticos, dentre eles o LQB-223. Estudos recentes demonstraram que o LQB-223 induziu toxicidade para células leucêmicas e reduzido efeito tóxico para células não neoplásicas (Buarque *et al.*, 2014).

Dessa forma, a primeira pergunta do nosso estudo foi investigar se o composto LQB-223 apresentaria citotoxicidade para células derivadas de câncer de mama. Assim, realizamos o ensaio de MTT e observamos que o tratamento com LQB-223 reduziu a formação dos cristais de formazan (Figura **5.1a** e **5.1b**). Para a linhagem MCF-7, a exposição durante 48 h na concentração de 5 µM de LQB-223, resultou na redução de cerca de 20% na absorbância, quando comparado com o controle de células não tratadas (CTR) ou com DMSO ($p < 0.01$). Após 48 h o tratamento com 20 µM de LQB-223 apresentou redução de 40% ($p < 0.001$) (Figura **5.1a**). O efeito se manteve no tempo de 72 h para concentrações a partir de 5 µM. Para a linhagem MDA-MB-231, o tratamento com 20 µM de LQB-223 após 72 h de exposição, apresentou percentuais próximos a 40% de redução na absorbância ($p < 0,01$) (Figura **5.1b**).

Além do tratamento com LQB-223, as células foram tratadas com 100 nM de DTX e 1 µM de DOX (Gewirtz, 1999; Hernández-Vargas *et al.*, 2007). Para a linhagem MCF-7, ambos os quimioterápicos apresentaram efeito a partir

de 24 h, e para a linhagem MDA-MB-231, o efeito mais pronunciado foi observado somente em 72 h (Figura **5.1a** e **5.1b**).

Posteriormente, confirmamos a citotoxicidade induzida pelo LQB-223 pela avaliação da formação de colônias, onde foi verificado que o tratamento com LQB-223 reduziu o potencial de formação de colônias quando comparado com os pontos CTR e DMSO (Figura **5.2a** e **5.2b**). O LQB-223 ocasionou redução de 50% da clonogenicidade para ambas as linhagens.

Corroborando com os dados obtidos no ensaio de MTT e clonogênico, foram observadas alterações morfológicas nas células MCF-7 e MDA-MB-231 mediante o tratamento com LQB-223 por 48 h. O efeito foi verificado nas concentrações de 5 e 20 μM para MCF-7 e 20 μM para MDA-MB-231 (Figura **5.3** e **5.4**). Esses resultados apontam para uma indução de toxicidade pelo composto LQB-223 em células derivadas de câncer de mama.

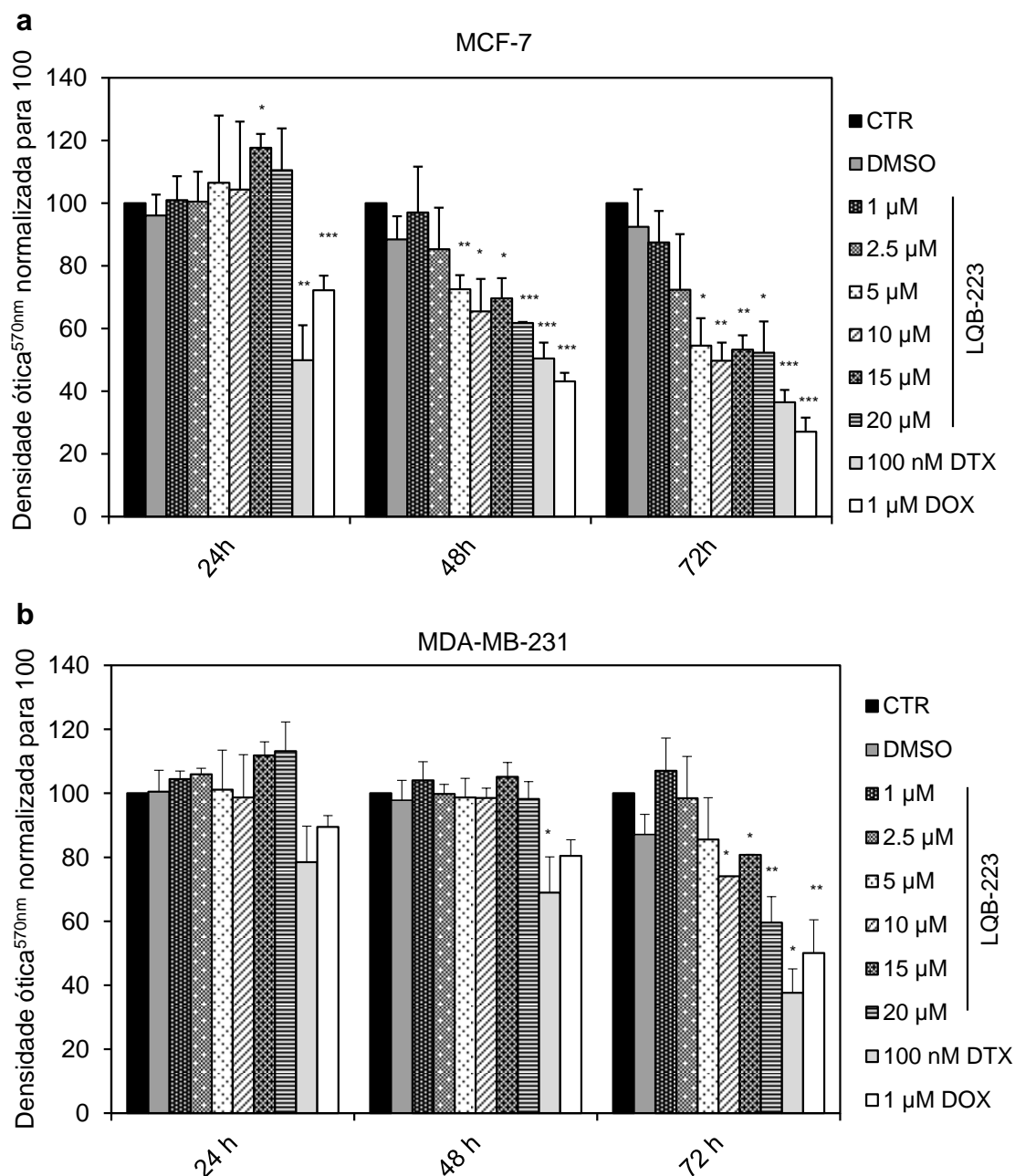


Figura 5.1: Alterações na viabilidade celular induzidas pelo composto LQB-223 nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231. As células MCF-7 **(a)** e MDA-MB-231 **(b)** foram cultivadas em placas de 96 poços e, após 24 h de adesão, foram expostas a diferentes concentrações de LQB-223, 100 nM de DTX e 1 μM DOX durante 24, 48 e 72h. A análise da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de MTT e a leitura foi feita a 570 nm. As células tratadas foram comparadas com o controle de células não tratadas. O gráfico corresponde às médias e desvio padrão de três experimentos independentes. (Teste *t student*, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; considerado estatisticamente significativo). CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfoxido, DTX; Docetaxel, DOX; Doxorubicina.

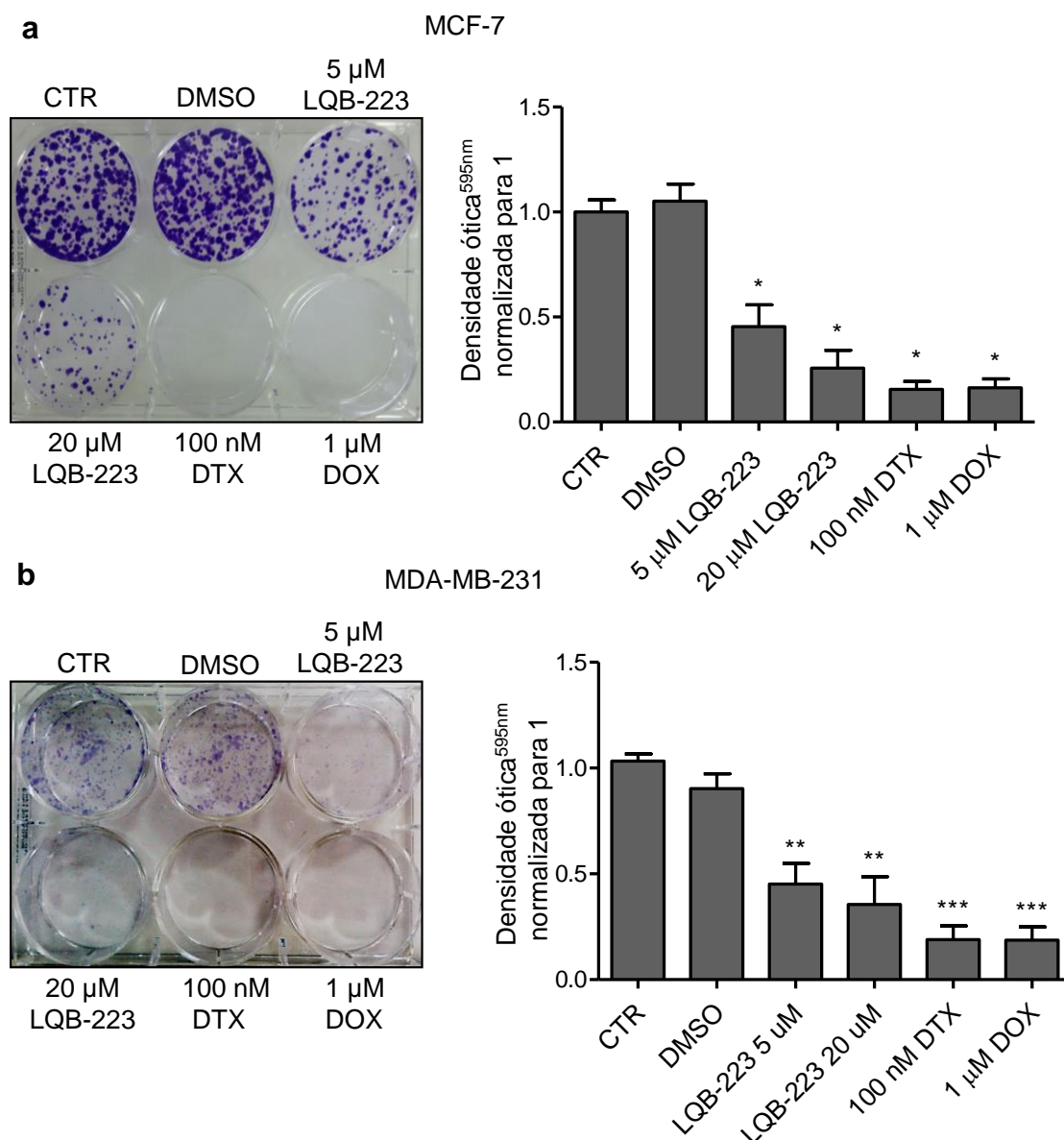


Figura 5.2: Alterações no padrão de formação de colônias mediante o tratamento com LQB-223 nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231. As células MCF-7 **(a)** e MDA-MB-231 **(b)** foram plaqueadas e, após 24 h de adesão, foram expostas a 5 e 20 μM de LQB-223, 100 nM de DTX e 1 μM DOX. Após 24 h de exposição aos compostos, foi adicionado meio sem droga e as células foram mantidas em cultura por cerca de 14 dias. Após formação das colônias, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta para posterior dissolução em ácido acético a 33 % e a leitura foi feita em 595 nm. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes. (Teste *t student*; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; considerado estatisticamente significativo). CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido, DTX; Docetaxel, DOX; Doxorubicina.

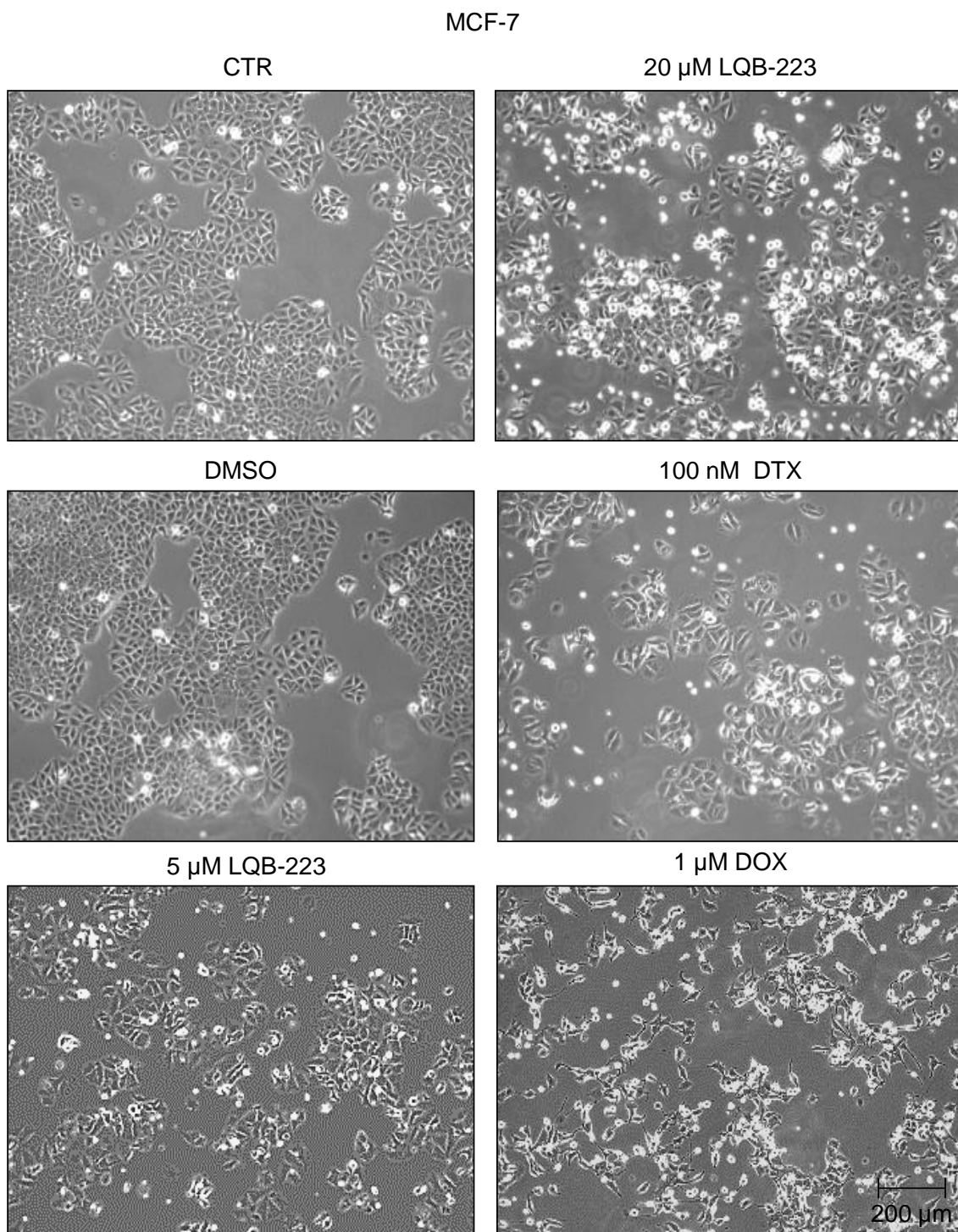


Figura 5.3: Alterações morfológicas na linhagem MCF-7 após o tratamento com LQB-223. As células MCF-7 foram plaqueadas e após 24 h de adesão, foram expostas a 5 e 20 μ M de LQB-223, 100 nM de DTX e 1 μ M de DOX. Após 48 h de exposição aos compostos, fotomicrografias foram feitas para análise das alterações morfológicas induzidas pelos tratamentos. As imagens foram obtidas em um microscópio ótico invertido e são representativas de três experimentos independentes. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido, DTX; Docetaxel, DOX; Doxorubicina.

MDA-MB-231

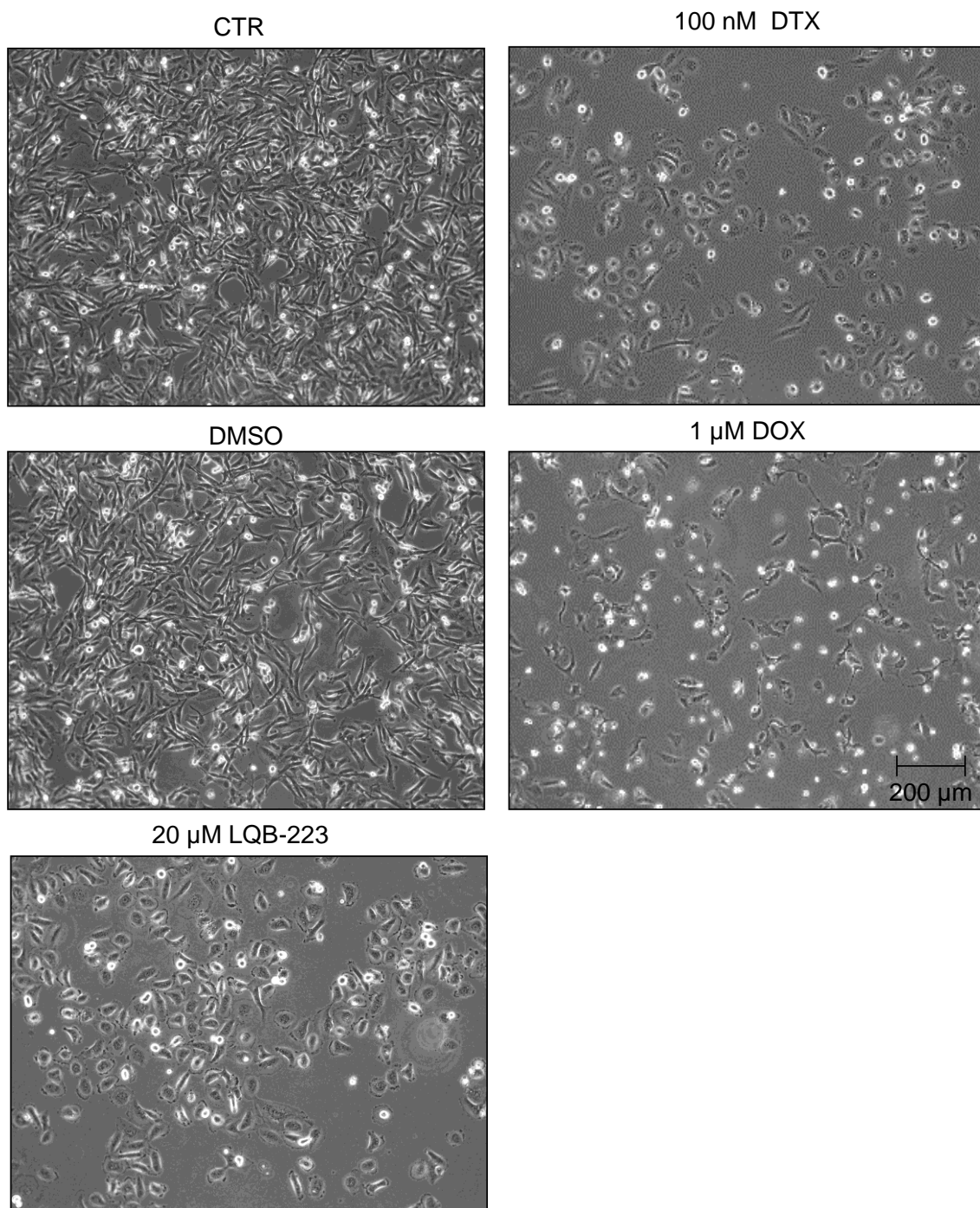


Figura 5.4: Alterações morfológicas na linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com LQB-223. As células MDA-MB-231 foram plaqueadas e após 24 h de adesão, foram expostas a 5 e 20 μM de LQB-223, 100 nM de DTX e 1 μM de DOX. Após 48 h de exposição aos compostos, fotomicrografias foram feitas para análise das alterações morfológicas induzidas pelos tratamentos. As imagens foram obtidas em um microscópio óptico invertido e são representativas de três experimentos independentes. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido, DTX; Docetaxel, DOX; Doxorubicina.

5.2 O composto LQB-223 induz toxicidade inferior aos quimioterápicos DOX e DTX na linhagem de mama não neoplásica HB4a

A quimioterapia utilizada na clínica apresenta toxicidade para células saudáveis de pacientes com câncer de mama. As antraciclinas, como a DOX, contribuem para indução de cardiotoxicidade nessas pacientes, e os taxanos, como DTX, podem induzir um quadro de severa anemia, neutropenia e trombocitopenia (Murtagh *et al.*, 2016; Panis *et. al*, 2011). Desta forma, a busca por novos compostos que sejam menos tóxicos para os pacientes é de extrema importância. Tendo em vista que o tratamento de células saudáveis do sistema imune de humanos e camundongos não apresentou toxicidade mediante o tratamento com LQB-223 (Buarque *et al.*, 2014), o próximo passo foi avaliar os efeitos do tratamento em células não-neoplásicas de mama. E para tanto, células HB4a, originalmente extraídas da mama adjacente de uma paciente portadora de câncer de mama (Stamps *et al.*, 1994), foram utilizadas.

Com base no ensaio de MTT, foi verificado que o tratamento com 5 e 20 μM de LQB-223 não apresentou toxicidade para a linhagem HB4a em nenhum dos tempos de exposição avaliados. Em contrapartida, o tratamento com 100 nM de DTX induziu redução da metabolização de sais de MTT a partir de 48 h de tratamento ($p < 0.001$) e 1 μM de DOX induziu significativa redução a partir de 24 h ($p < 0.01$) (Figura 5.5a). Foi também avaliada a capacidade de formação de colônias mediante o tratamento com 5 e 20 μM de LQB-223, 100 nM de DTX e 1 μM DOX e foi verificado que o tratamento levou à diminuição na formação de colônias em todas as concentrações testadas. Entretanto, o tratamento com DOX e DTX induziu efeito mais pronunciado na redução do padrão de formação de colônias que o LQB-223 (Figura 5.5b). Ainda para verificar o efeito citotóxico do LQB-223, foi avaliada a morfologia das células HB4a após 48 h de exposição ao composto e foi observada uma alteração mediante o tratamento com LQB-223 nas concentrações de 5 e 20 μM (Figura 5.6). Assim como nos outros ensaios, os efeitos de toxicidade foram inferiores aos induzidos pela DOX e DTX, sugerindo que o composto possa apresentar efeito preferencial para células neoplásicas.

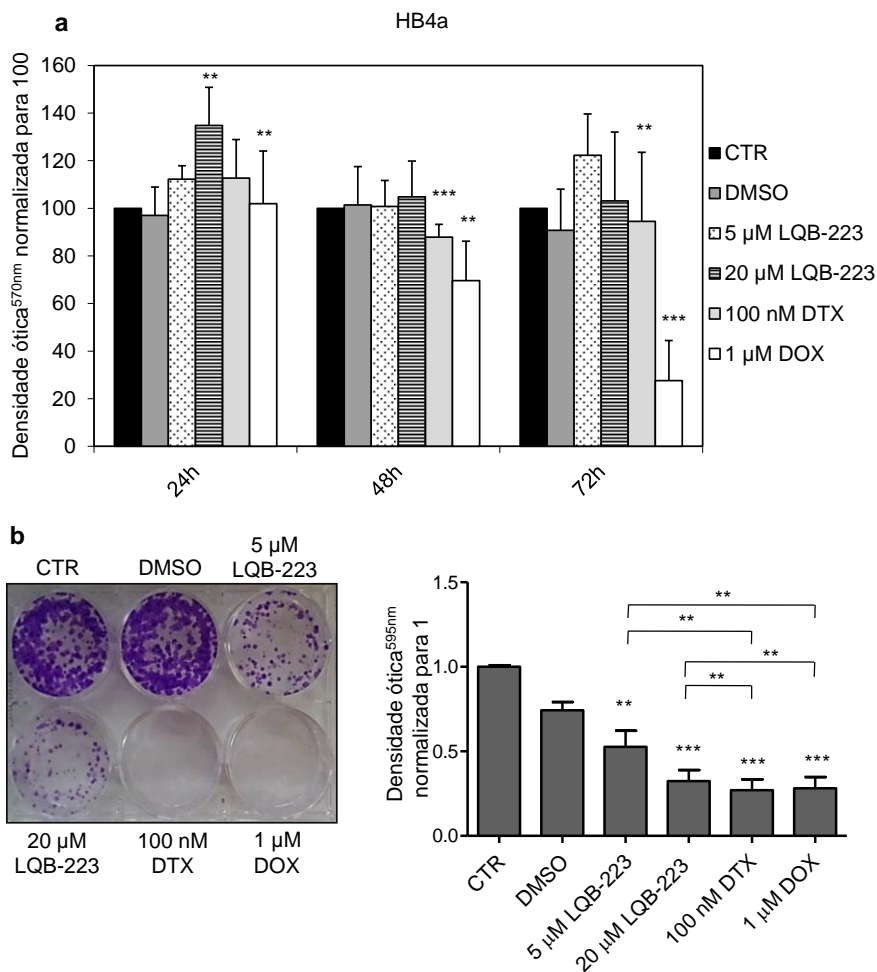


Figura 5.5: Alterações na viabilidade celular e formação de colônias induzidas pelo LQB-223 na linhagem celular não neoplásica HB4a. As células HB4a foram plaqueadas em placas de 96 poços e, após 24 h de adesão, foram expostas a 5 e 20 μM de LQB-223, 100 nM de DTX e 1 μM DOX durante 24, 48 e 72h. A análise da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de MTT e a leitura foi feita a 570 nm. As células tratadas foram comparadas com o controle de células não tratadas (**a**). Para avaliação da formação de colônias as células HB4a foram plaqueadas e após 24 h de adesão, foram expostas a 5 e 20 μM de LQB-223, DTX na concentração de 100 nM e DOX a 1 μM . Após 24 h de exposição aos compostos, foi adicionado meio sem droga e as células foram mantidas em cultura por cerca de 14 dias. Após formação das colônias, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta para posterior dissolução em ácido acético 33 % e leitura em 595 nm (**b**). Os gráficos são representativos de três experimentos independentes. Os dados obtidos após o tratamento com LQB-223 foram comparados com o tratamento com DMSO, que é utilizado como veículo para diluição do LQB-223. Os demais tratamentos, DTX e DOX foram comparados com o ponto CTR. Além dessas comparações, foram analisadas as diferenças entre os tratamentos, LQB-223 e DTX e DOX, que estão representadas com asteriscos sobre os colchetes. (Teste *t student*; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; considerado estatisticamente significativo). CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfoxido, DTX; Docetaxel, DOX; Doxorubicina.

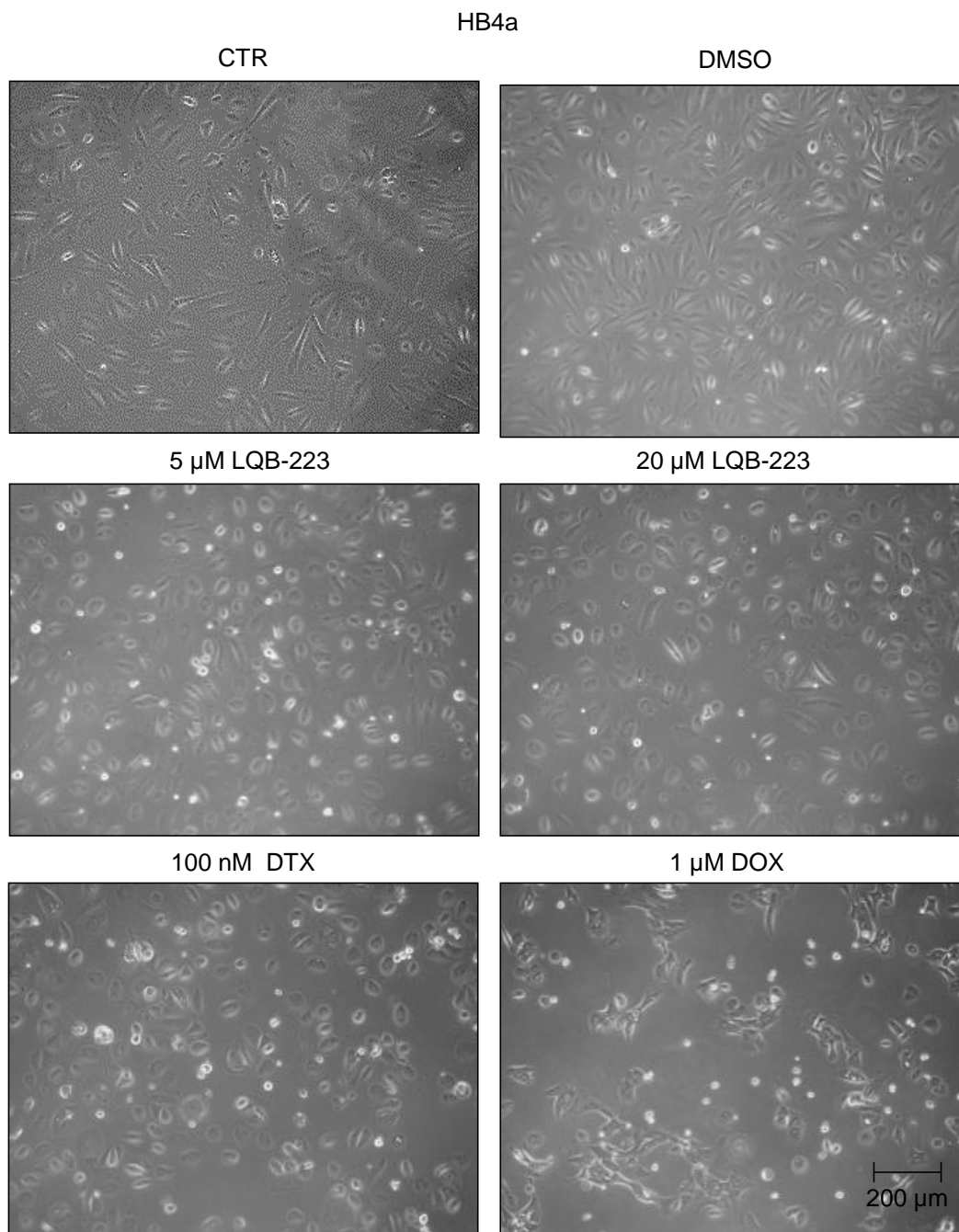


Figura 5.6: Alterações morfológicas na linhagem HB4a após exposição ao LQB-223. As células HB4a foram plaqueadas e, após 24 h de adesão, foram expostas a 5 e 20 μ M de LQB-223, 100 nM de DTX e 1 μ M de DOX. Após 48 h de exposição aos compostos, foram feitas fotomicrografias para análise das alterações morfológicas induzidas pelos tratamentos. As imagens foram obtidas em um microscópio óptico invertido (Axio Observer.Z1, Zeiss) e são representativas de três experimentos independentes. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido, DTX; Docetaxel, DOX; Doxorubicina.

5.3 O composto LQB-223 altera o perfil do ciclo celular, causando um arresto em G2/M nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.

O próximo passo do trabalho foi avaliar se o tratamento com LQB-223 estaria alterando a distribuição no ciclo celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Assim, foi analisada a distribuição do ciclo celular a partir do conteúdo de DNA por incorporação de PI. Para a linhagem MCF-7, o tratamento com 5 μ M de LQB-223 em 24 h resultou em parada no ciclo celular na fase G2/M com um percentual de 60% (Figura **5.7a**). Este efeito também foi observado em 48 h de tratamento, entretanto, após 72 h, o percentual de células paradas em G2/M diminuiu para 30%, enquanto que em G1 aumentou 35% com relação ao tempo de 48 h. Não foi observado aumento de fragmentação de DNA nessa concentração (Figura **5.7a**). Quando as células foram tratadas com 20 μ M de LQB-223, houve parada com cerca de 50% de células em G2/M e se manteve até 72 h de tratamento. Houve também nesta condição um aumento de células em sub-G0, fase que reflete o conteúdo hipodiplóide característico de fragmentação do DNA. Em comparação, o tratamento com 100 nM de DTX também resultou em aumento de fragmentação. Para a linhagem MDA-MB-231 não foi observada alteração no percentual de fragmentação.

De forma semelhante, o tratamento com 20 μ M de LQB-223 induziu parada no ciclo celular da linhagem MDA-MB-231 após 72 h de exposição, exibindo aproximadamente 65% de células paradas em G2/M. Ao longo de 48 e 72 h de tratamento, o percentual de células paradas reduziu para 40 e 30%, respectivamente. O mesmo perfil de distribuição de fases foi observado após o tratamento com 100 nM de DTX (Figura **5.7b**). Também foi observado que o tratamento em tempos mais prolongados, 48 e 72 h, resulta na presença de células hiperdiploides (Figura **5.7b**). O tratamento com 1 μ M de DOX resultou em uma distribuição mais heterogênea para ambas as linhagens (Figuras **5.7a e 5.7b**).

O próximo passo do estudo foi investigar o perfil de expressão de proteínas diretamente envolvidas com a regulação do ciclo celular: p53 e p21. Ambas são importantes proteínas reguladoras do ciclo celular e que estão envolvidas no reparo de células nos pontos de checagem referentes a G2/M

(Wang *et al.*, 2015). A p53 regula a expressão de p21 em resposta a um dano celular resultando na parada do ciclo celular (Prives, 1993). Assim, observamos que o tratamento com 5 e 20 μ M de LQB-223 modulou os níveis protéicos de p53 e p21 nas células MCF-7, gradativamente nos tempos de 48 e 72 h (Figura **5.8a**). Diferentemente, não ocorreu modulação da expressão de p53 e p21 nas células MDA-MB-231 (Figura **5.8b**), que apresentam mutação no gene *TP53*. As células MDA-MB-231 apresentam a proteína funcional p73, que pode assumir parcialmente as funções da p53, ou quando esta se apresenta não funcional (Vayssade *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2017). Estes dados sugerem que a parada no ciclo celular na fase G2/M mediante o tratamento com LQB-223 pode ocorrer de forma independente da expressão ou funcionalidade da proteína p53.

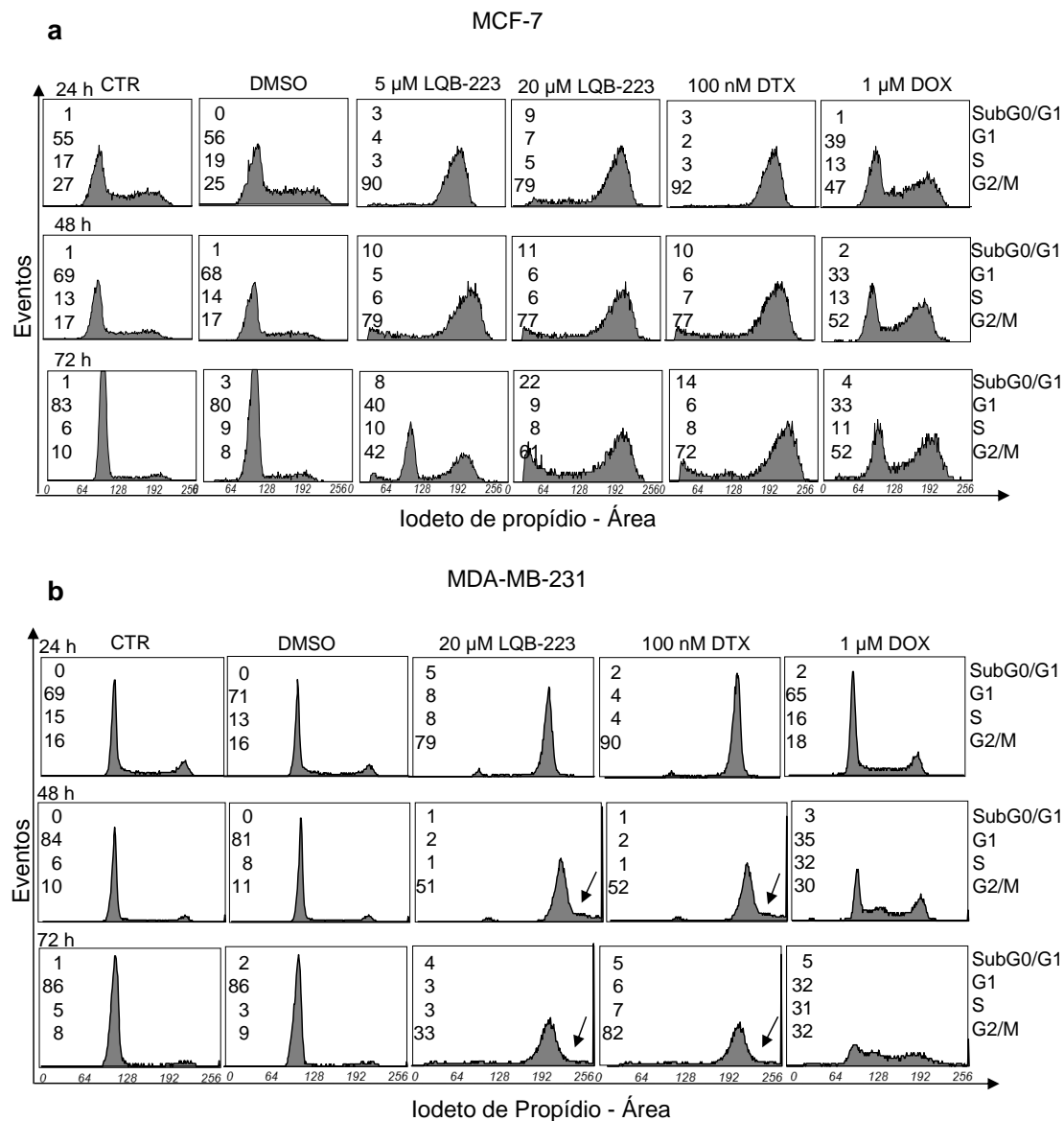


Figura 5.7: Efeito do LQB-223 na distribuição de fases do ciclo celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. As células MCF-7 (a) e MDA-MB-231 (b) foram plaqueadas e após 24 h de adesão, foram expostas a 5 e 20 μM de LQB-223, 100 nM de DTX e 1 μM de DOX. Após 24, 48 e 72 h de exposição aos compostos, as células foram tripsinizadas, marcadas com PI e tiveram o seu conteúdo de DNA examinado por citometria de fluxo. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes. As setas apontam para populações com conteúdo de DNA hiperplóide. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido, DTX; Docetaxel, DOX; Doxorubicina.

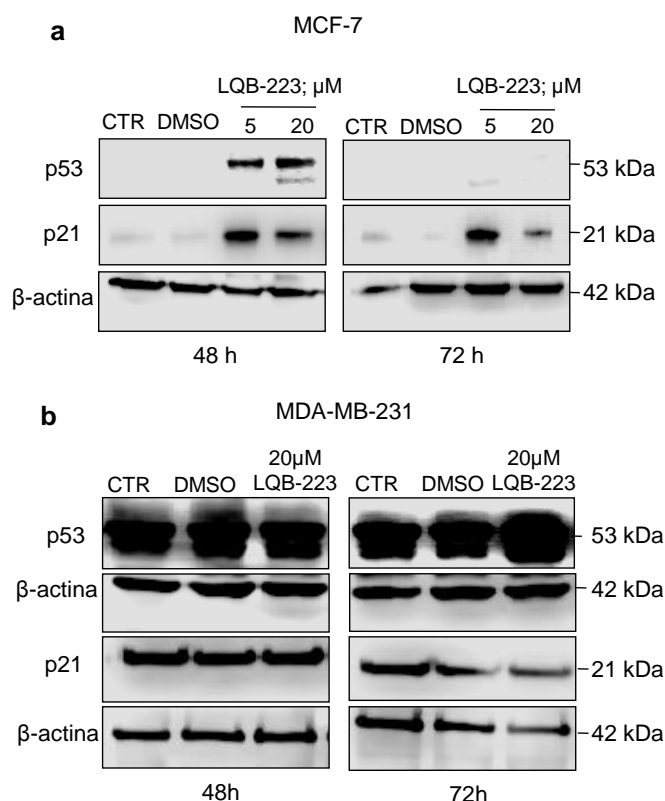


Figura 5.8: Avaliação dos níveis protéicos de p53 e p21 após exposição das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 ao composto LQB-223. As linhagens celulares MCF-7 (**a**) e MDA-MB-231 (**b**) foram expostas a 5 e 20 μM de LQB-223 durante 48 e 72 h e então, tiveram suas proteínas extraídas e avaliadas quanto à expressão de p53 e p21 por Western blotting. A extração das proteínas foi realizada através do tampão de extração Invitrogen[®]. A β -actina foi utilizada como controle constitutivo das proteínas. Os blots são representativos de três experimentos independentes. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido.

5.4 O tratamento com o composto LQB-223 induz morte celular mediada por caspases nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.

Para investigar o tipo de morte induzida pelo tratamento com o LQB-223, as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram submetidas à marcação de anexina V/PI. Para a linhagem MCF-7, a exposição a 5 e 20 μM de LQB-223 induziu cerca de 20% de células com anexina V após 72 h de tratamento com relação ao CTR (Figura 5.9a). Este ensaio representa um indicativo de morte celular por apoptose, entretanto, para melhor evidenciar esse efeito, foram avaliados

os níveis proteicos das procaspases -7 e -9. Após 48 h de tratamento com 5 e 20 μ M de LQB-223, foi observada redução dos níveis de ambas procaspases (Figura **5.9b**). A avaliação dos mesmos parâmetros para a linhagem MDA-MB-231 resultou em um padrão de efeito muito semelhante ao observado na MCF-7. Para a linhagem MDA-MB-231, o tratamento com 20 μ M de LQB-223 induziu aumento de 15% de células marcadas com anexina V após 48 h quando comparado com o CTR. Após 72 h de tratamento, a quantidade de células marcadas com anexina V aumentou para 20% (Figura **5.10a**). O tratamento com 20 μ M de LQB-223 resultou em diminuição dos níveis proteicos das procaspases -3 e -7 (Figura **5.10b**). A caspase 3 é a principal caspase efetora, envolvida na ativação da apoptose (Zamaraev *et al.*, 2017). As procaspases representam formas inativas das caspases, e são ativadas mediante clivagem proteolítica, dando origem às caspases (Parrish *et al.*, 2013). Devido à diminuição das procaspases, sugere-se que o tratamento induziu a ativação de caspases de diferentes classes: efetora, com ativação da caspase 7 ou 3; e iniciadora, a caspase 9 (Kumar, 1999; Zamaraev *et al.*, 2017). A partir da ativação dessas caspases, pode-se inferir que houve desencadeamento da via intrínseca da apoptose (Ow *et al.*, 2008).

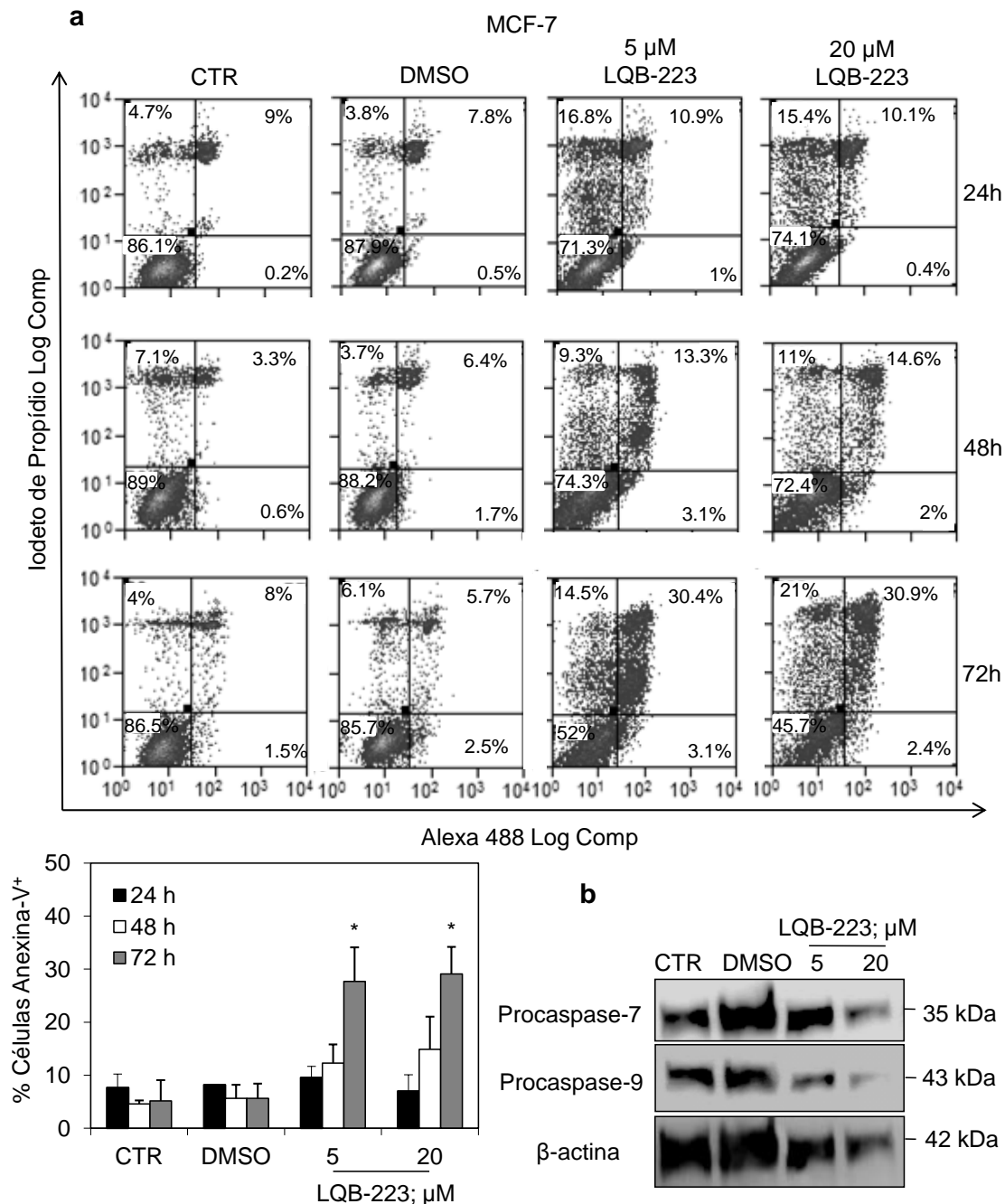


Figura 5.9: Alterações no perfil de marcação de anexina V/PI e expressão das procaspases -7 e -9 mediante o tratamento da linhagem celular MCF-7 com o composto LQB-223. A linhagem celular MCF-7 foi exposta a 5 e 20 μ M de LQB-223 durante 24, 48 e 72 h e submetida ao protocolo de marcação de anexina V/PI. Foram quantificadas as células marcadas positivamente com anexina V. Os histogramas e os gráficos são representativos de três experimentos independentes (Teste *t student*, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; considerado estatisticamente significativo) (a). Para avaliação das procaspases -7 e -9, a linhagem MCF-7 foi exposta a 5 e 20 μ M de LQB-223 durante 48 h. A extração das proteínas foi realizada através do tampão de extração Invitrogen® e a análise da expressão feita por Western blotting. A β -actina foi utilizada como controle constitutivo das proteínas (b). CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfoxido.

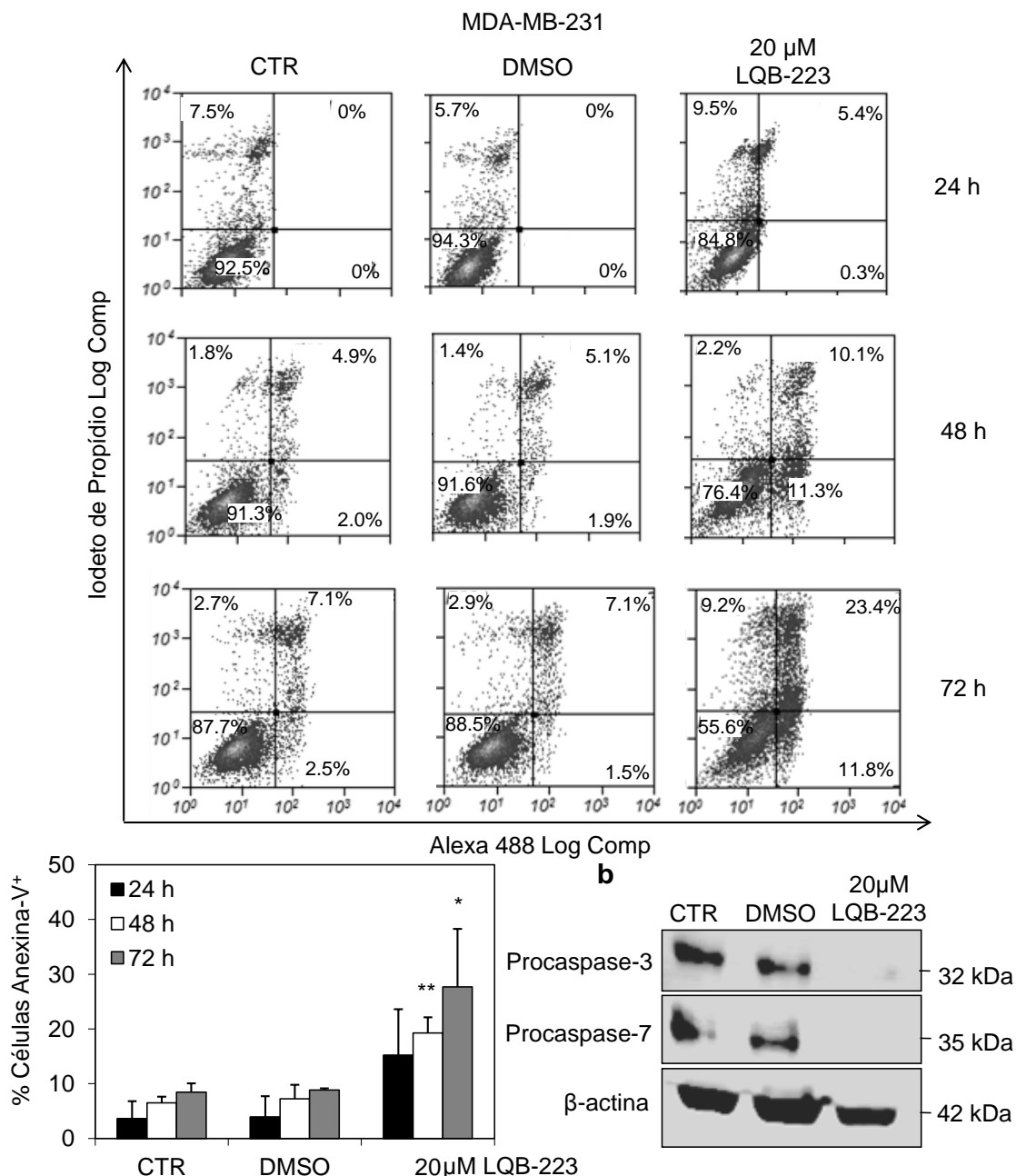


Figura 5.10: Alterações no perfil de marcação de anexina V/PI e expressão das procaspases -3 e -7 mediante o tratamento da linhagem celular MDA-MB-231 com o composto LQB-223. A linhagem celular MDA-MB-231 foi exposta a 20 μM de LQB-223 durante 24, 48 e 72 h e submetida ao protocolo de marcação de anexina V/PI. Foram quantificadas as células marcadas positivamente com anexina V. Os histogramas e os gráficos são representativos de três experimentos independentes (Teste *t student*; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; considerado estatisticamente significativo) **(a)**. Para avaliação das procaspases -3 e -7 a linhagem MDA-MB-231 foi exposta a 20 μM de LQB-223 durante 48 h. A extração das proteínas foi realizada através do tampão de extração Invitrogen® e a análise da expressão feita por Western blotting. A β-actina foi utilizada como controle constitutivo das proteínas **(b)**. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido.

5.5 O tratamento com LQB-223 modula a expressão das proteínas FOXM1, Mcl-1, XIAP, Survivina e c-IAP1 nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.

Para a investigação dos possíveis mecanismos envolvidos na sensibilização das células MCF-7 e MDA-MB-231 pelo LQB-223, foi feito um painel de expressão de proteínas envolvidas na resistência à múltiplas drogas. Inicialmente, observamos níveis proteicos de FOXM1, cIAP1, c-IAP2, XIAP, Survivina e Mcl-1, proteínas envolvidas na maquinaria apoptótica, mais elevados na linhagem MDA-MB-231 (Figura **5.11a**). A proteína Bcl-2 apresentou-se mais expressa em MCF-7 e Smac/DIABLO com níveis semelhantes para ambas as linhagens (Figura **5.11a**)

Para identificar se as proteínas acima citadas seriam alvos do tratamento com LQB-223, as células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com LQB-223 foram submetidas ao protocolo de *Western blotting*. Foi observado que o tratamento reduziu os níveis proteicos de c-IAP1 após 48 h para ambas as linhagens, houve também redução na expressão de XIAP após 24 h para MCF-7 e 8 h para o tratamento da linhagem MDA-MB-231 e também reduziu os níveis de Mcl-1 após 8 h de exposição ao LQB-223 para ambas as linhagens (Figura **5.11b**). De forma importante, houve um aumento pronunciado de expressão de Survivina em 24 h para ambas as linhagens e de FOXM1, apenas para a linhagem MDA-MB-231 (Figura **5.11b e c**). Esses resultados sugerem que proteínas envolvidas com a resistência a apoptose são diferencialmente moduladas pelo composto LQB-223.

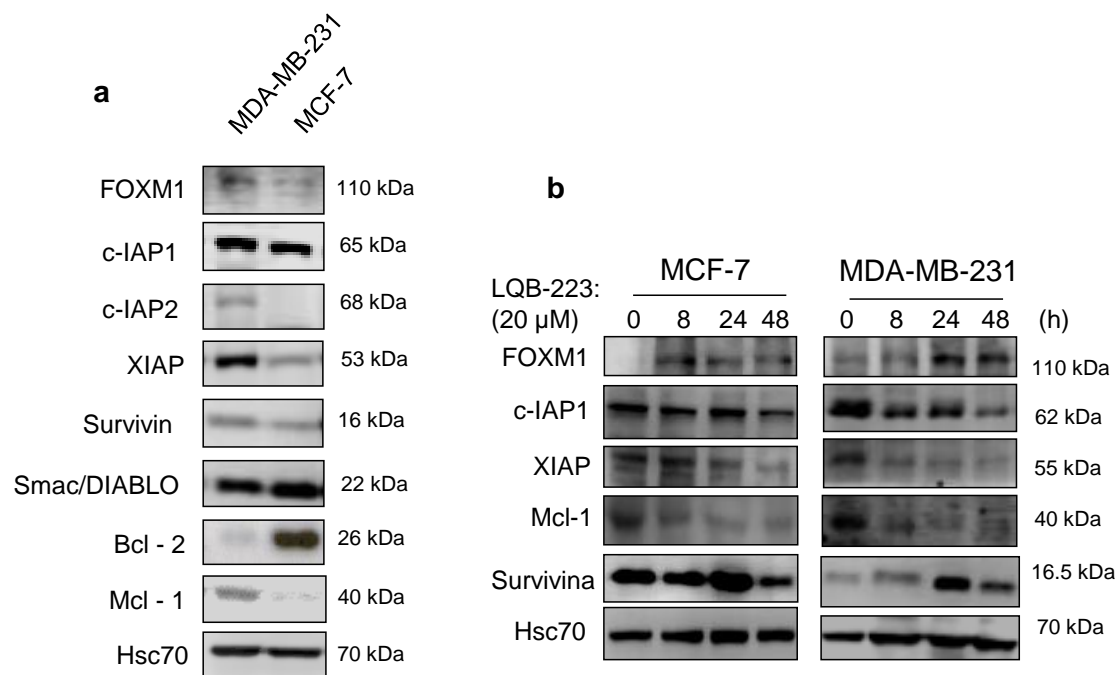


Figura 5.11: Expressão de proteínas relacionadas à resistência às drogas nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 antes e após o tratamento com LQB-223. As linhagens celulares foram submetidas ao protocolo de lise para extração de proteínas com tampão Invitrogen® e foram posteriormente avaliadas por Western blotting. A expressão basal das isoformas da topoisomerase II α e β , do fator de transcrição FOXM1 e das proteínas envolvidas com a apoptose Survivina, XIAP, cIAP-1, cIAP-2, Smac/DIABLO, MCL1 e Bcl-2 foram comparadas entre as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 (**a**). As células MCF-7 e MDA-MB-231 foram expostas ao tratamento com 20 μ M de LQB-223 por 0, 8, 24 e 48 h, quando as proteínas foram extraídas e a avaliação da variação da expressão de FOXM1, Survivina, XIAP, cIAP-1 e MCL-1 ao longo do tratamento foi realizada (**b**; **c**). As proteínas β -actina e Hsc70 foram utilizadas como controle constitutivo das proteínas.

5.6 A redução da taxa migratória das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 ocorreu após exposição ao composto LQB-223.

Evidências crescentes apontam para a interrelação entre o fenótipo de resistência a drogas e a aquisição de características migratórias e invasivas em neoplasias (Karlsson *et al.*, 2017). Diante desse contexto, a capacidade migratória é um importante evento a ser avaliado, pois células tumorais apropriam-se desta estratégia para colonizar diferentes tecidos (Cejalvo *et al.*, 2017).

Para avaliação da migração das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 mediante o tratamento com 5 e 20 μM de LQB-223 foi realizado o ensaio de *Wound-healing*. Para a linhagem MCF-7, somente a concentração de 20 μM do composto acarretou a diminuição da taxa de migração (Figura 5.12 e 5.13a). Como controle desse experimento, foi realizada a análise da proliferação celular que revelou que a manutenção das células a 0,1% SFB não foi acompanhada pela proliferação celular (Figura 5.13b e c). Para a linhagem MDA-MB-231 o tratamento com ambas as concentrações de 5 e 20 μM de LQB-223 diminuiu, de forma significativa, a taxa de migração após 24 h (Figura 5.14 e 5.15a). De forma consistente, confirmamos a ausência de alteração nas taxas de proliferação das células mantidas por 24 h a 0,1% e 10% de SFB (Figura 5.14b e c). Para ambas as linhagens, o tratamento com DTX reduziu a taxa migratória e em contrapartida, efeito que não foi observado com o tratamento com DOX. Esses dados sugerem que o composto LQB-223 interfere com a capacidade migratória de ambas as linhagens celulares. Com base nesses resultados, observamos que o LQB-223 apresenta efeito similar ao DTX para ambas as linhagens. Desta forma, não utilizamos esta droga como critério de comparação com o composto LQB-223, para os experimentos posteriores.

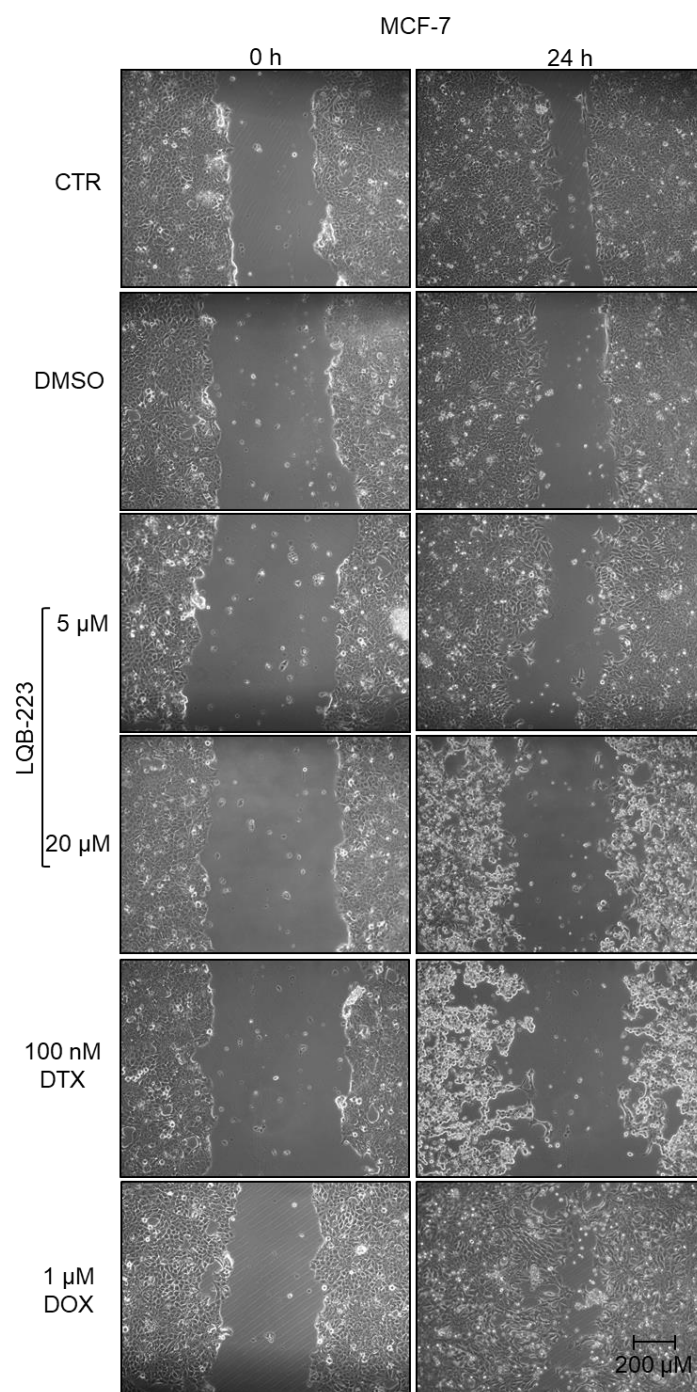


Figura 5.12: Avaliação do padrão de migração celular de células MCF-7 mediante o tratamento com LQB-223. Para avaliação da migração, foi realizado o ensaio de *wound-healing*, onde as células MCF-7 foram plaqueadas em meio DMEM contendo 0,1% de soro fetal bovino (SFB) e, após atingir confluência, foram feitas feridas na monocamada com auxílio de uma ponteira de 10 μ L. Em seguida, as células foram tratadas com 5 e 20 μ M de LQB-223, 100 nM de DTX e 1 μ M de DOX e mantidas em cultura por 24 h. As fotomicrografias foram feitas em 0 e 24 h após o tratamento. As imagens são representativas de três experimentos independentes. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfoxido, DTX; Docetaxel, DOX; Doxorubicina.

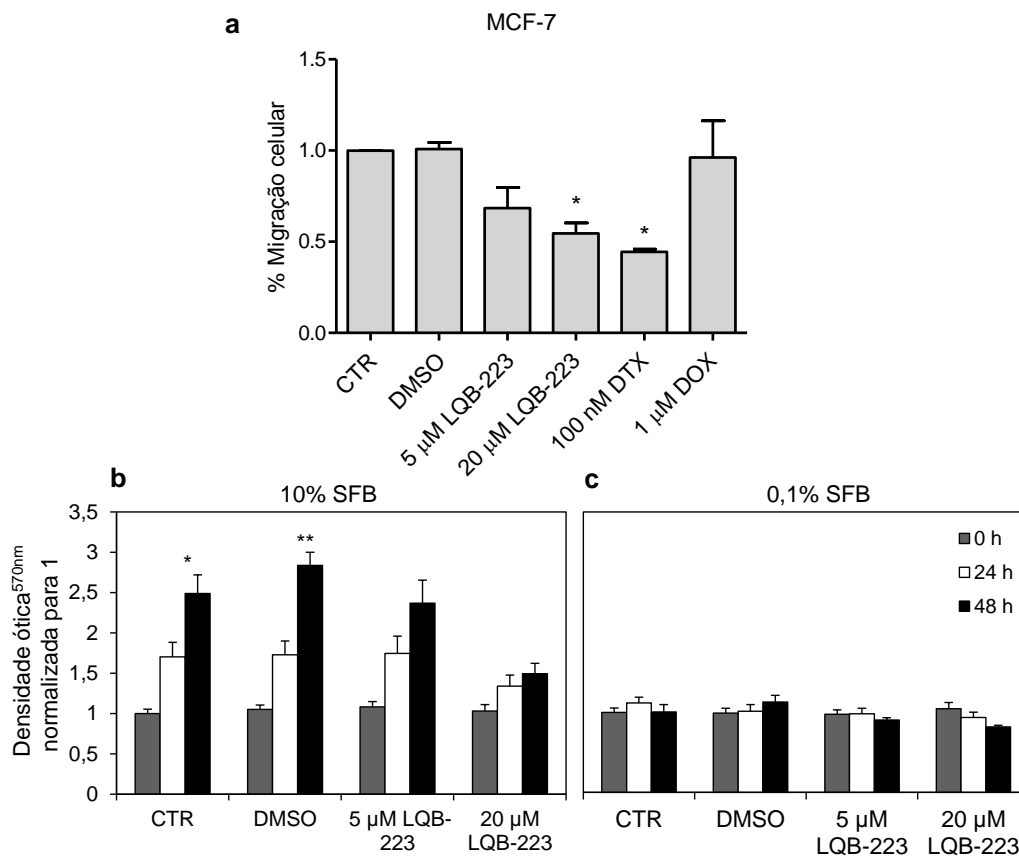


Figura 5.13: Avaliação da taxa de migração celular das células MCF-7 mediante o tratamento com LQB-223. Após a realização das feridas e o acompanhamento da migração durante 24 h, a taxa de migração das células MCF-7 **(a)** foi avaliada através da medição da área livre de células, com auxílio do software ImageJ. Como controle experimental do ensaio de *wound-healing*, as células tratadas ou não com o LQB-223 foram monitoradas quanto ao perfil de proliferação celular em meio contendo 10% **(b)** e 0,1% de SFB **(c)**. As células foram fixadas e coradas com cristal violeta imediatamente após a adesão (0h), 24 e 48 h após o tratamento com o LQB-223. A leitura foi realizada em 595 nm. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes. (Teste *t student*; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; considerado estatisticamente significativo). Magnificação: 10 x. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido, DTX; Docetaxel, DOX; Doxorubicina.

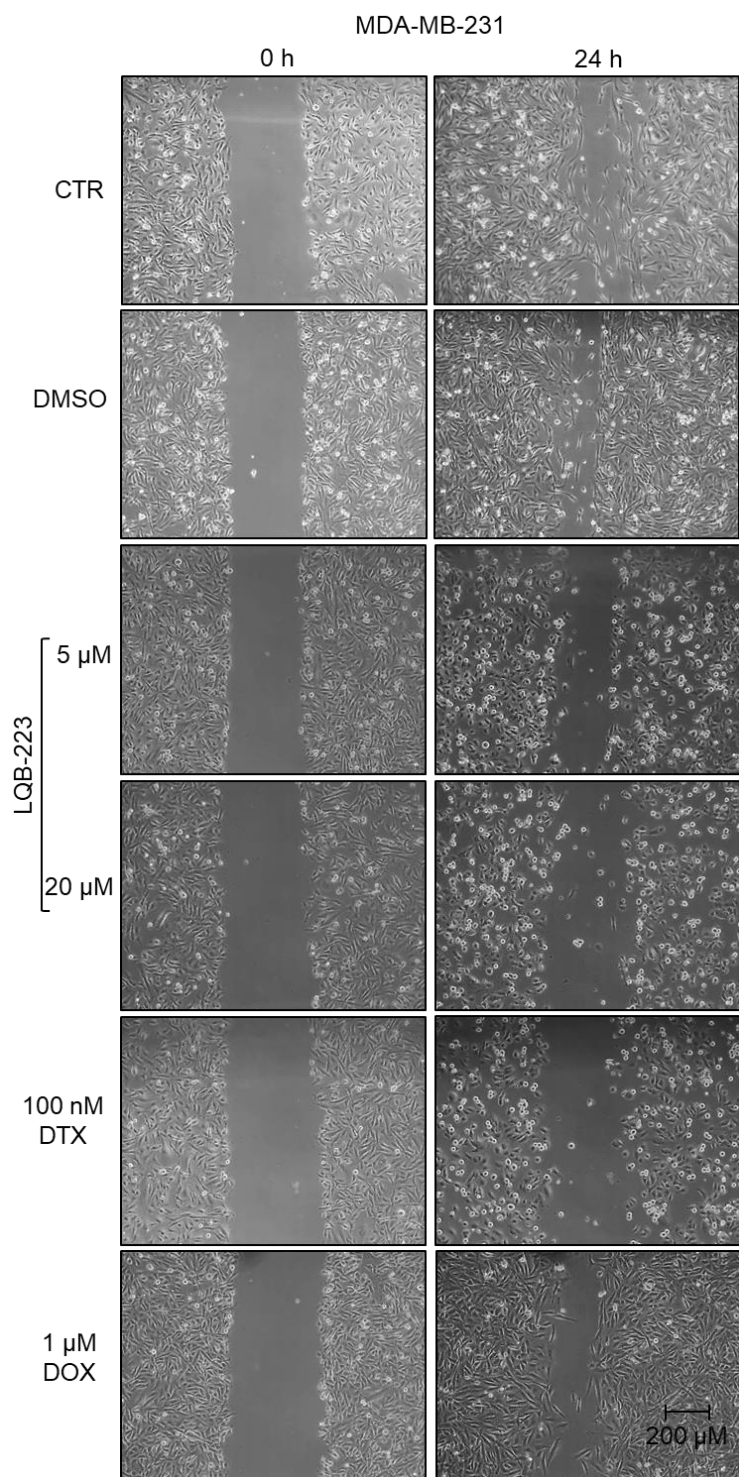


Figura 5.14: Avaliação do padrão de migração celular de células MDA-MB-231 mediante o tratamento com LQB-223. Para avaliação da migração, foi realizado o ensaio de *wound-healing*, onde as células MDA-MB-231 foram plaqueadas em meio DMEM contendo 0,1% de soro fetal bovino (SFB) e, após atingir confluência, foram feitas feridas na monocamada com auxílio de uma ponteira de 10 μ L. Em seguida, as células foram tratadas com 5 e 20 μ M de LQB-223, 100 nM de DTX e 1 μ M de DOX e mantidas em cultura por 24 h. As fotomicrografias foram feitas em 0 e 24 h após o tratamento. As imagens são representativas de três experimentos independentes. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfoxido, DTX; Docetaxel, DOX; Doxorubicina.

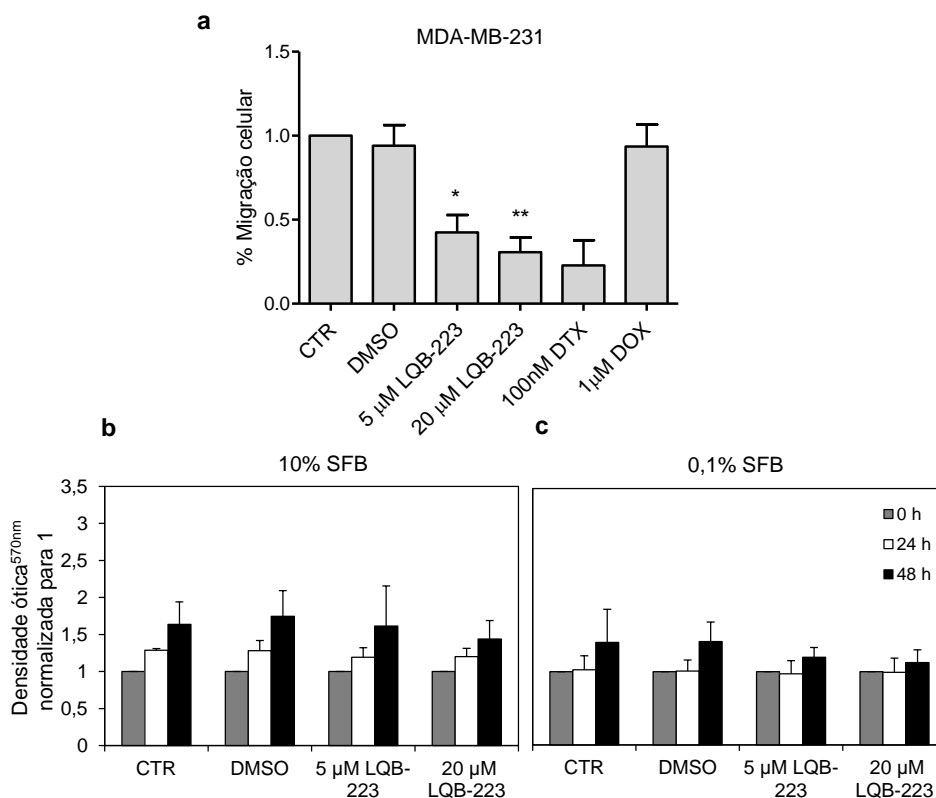


Figura 5.15: Avaliação da taxa de migração celular das células MDA-MB-231 mediante o tratamento com LQB-223. Após a realização das feridas e o acompanhamento da migração durante 24 h, a taxa de migração das células MDA-MB-231 **(a)** foi avaliada através da medição da área livre de células, com auxílio do software ImageJ. Como controle experimental do ensaio de *wound-healing*, as células tratadas ou não com o LQB-223 foram monitoradas quanto ao perfil de proliferação celular em meio contendo 10% **(b)** e 0,1% de SFB **(c)**. As células foram fixadas e coradas com cristal violeta imediatamente após a adesão (0h), 24 e 48 h após o tratamento com o LQB-223. A leitura foi realizada em 595 nm. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes. (Teste *t student*, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; considerado estatisticamente significativo). Magnificação: 10 x. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido, DTX; Docetaxel, DOX; Doxorubicina.

5.7 O tratamento com LQB-223 reduz a motilidade celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231

A motilidade celular é uma das características das células tumorais que permite a locomoção celular (Talmadge *et al.*, 2010). Este evento é imprescindível para a invasão celular através da membrana basal, iniciando a cascata metastática mediada por fatores de transcrição e proteínas como TGF-

β , MMP-2 e VEGF (Wells *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2018). Fatores associados à motilidade têm sido classificados como quimiocinéticos e quimiotáticos, determinando a direção da migração celular (Albrecht-Buehler, 1977; Liotta *et al.*, 1986). Dentre estes fatores que levam à motilidade das células estão a regulação das quinases, como por exemplo, MAP2K4 (mitogen-activated protein kinase 4) (Xu *et al.*, 2018). O ensaio fagocinético de ouro coloidal avalia a quimioquinesa das células, representada pela área do rastro formado por uma única célula (Albrecht-Buehler, 1977).

A partir da mensuração da área do rastro promovido pelas células que fagocitaram partículas de ouro coloidal, foi observado que o tratamento com LQB-223 reduziu a motilidade de células MCF-7 tratadas com 20 μ M de LQB-223 (Figura **5.16a** e **b**). A linhagem MDA-MB-231 mostrou-se mais sensível ao tratamento com LQB-223, reduzindo seu potencial de motilidade com 5 e 20 μ M de LQB-223 (Figura **5.17a** e **b**). De forma notável, o tratamento com DOX levou a um aumento da motilidade celular para ambas as linhagens.

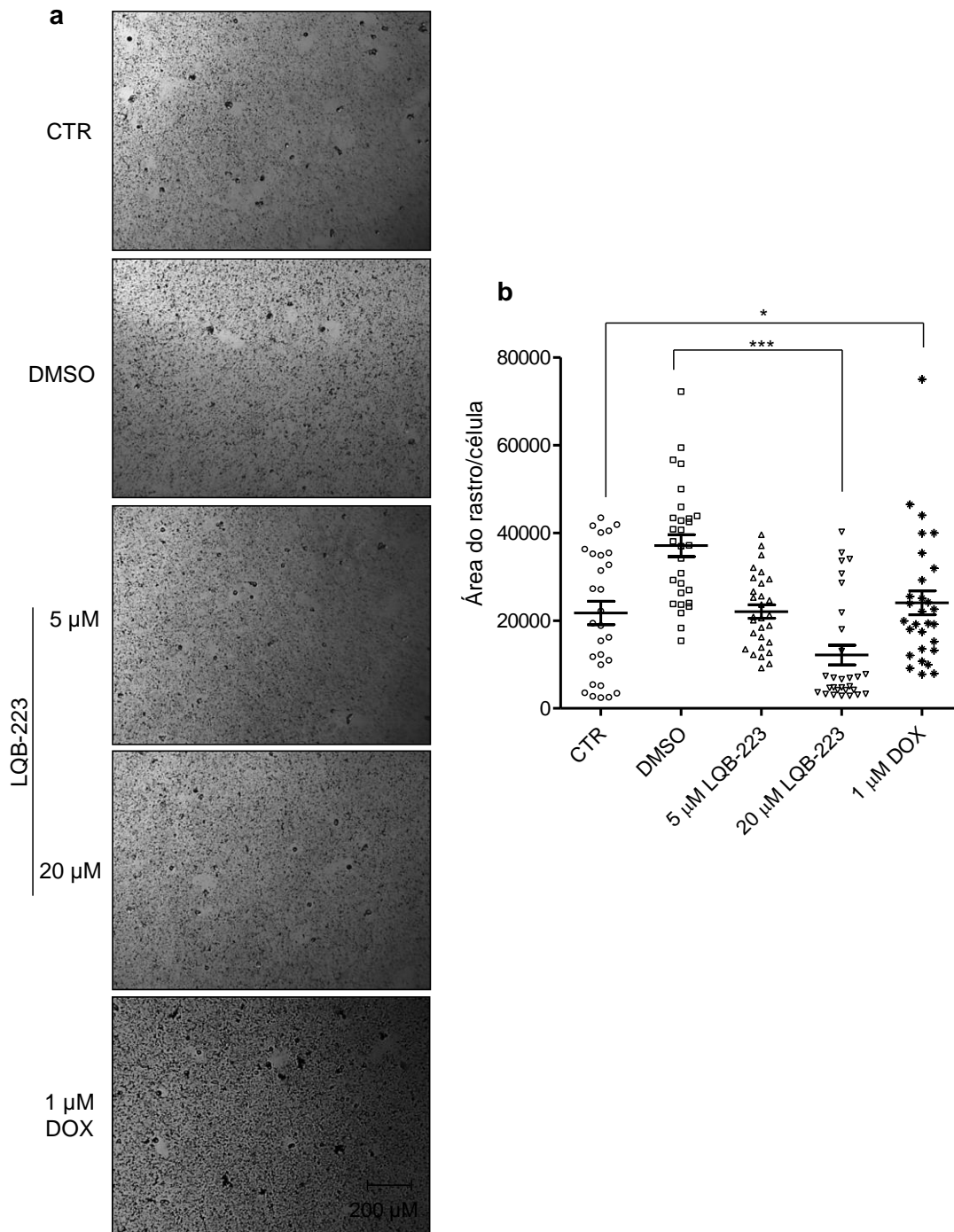


Figura 5.16: Análise da motilidade celular das linhagens MCF-7 após o tratamento com LQB-223. As células MCF-7 foram cultivadas em placas cobertas com solução de ouro coloidal e tratadas com 5 e 20 μM LQB-223 e 1 μM de DOX durante 24 h. A motilidade das células foi monitorada por microscópio óptico e a medição do rastro formado por cada célula foi feita com auxílio do software ImageJ. As imagens **(a)** e gráficos **(b)** representam três experimentos independentes. (Teste *D'Agostino and Pearson* para avaliar a distribuição amostral com *Wilcoxon* como teste de interferência; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; considerado estatisticamente significativo). CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido, DOX; Doxorrubicina.

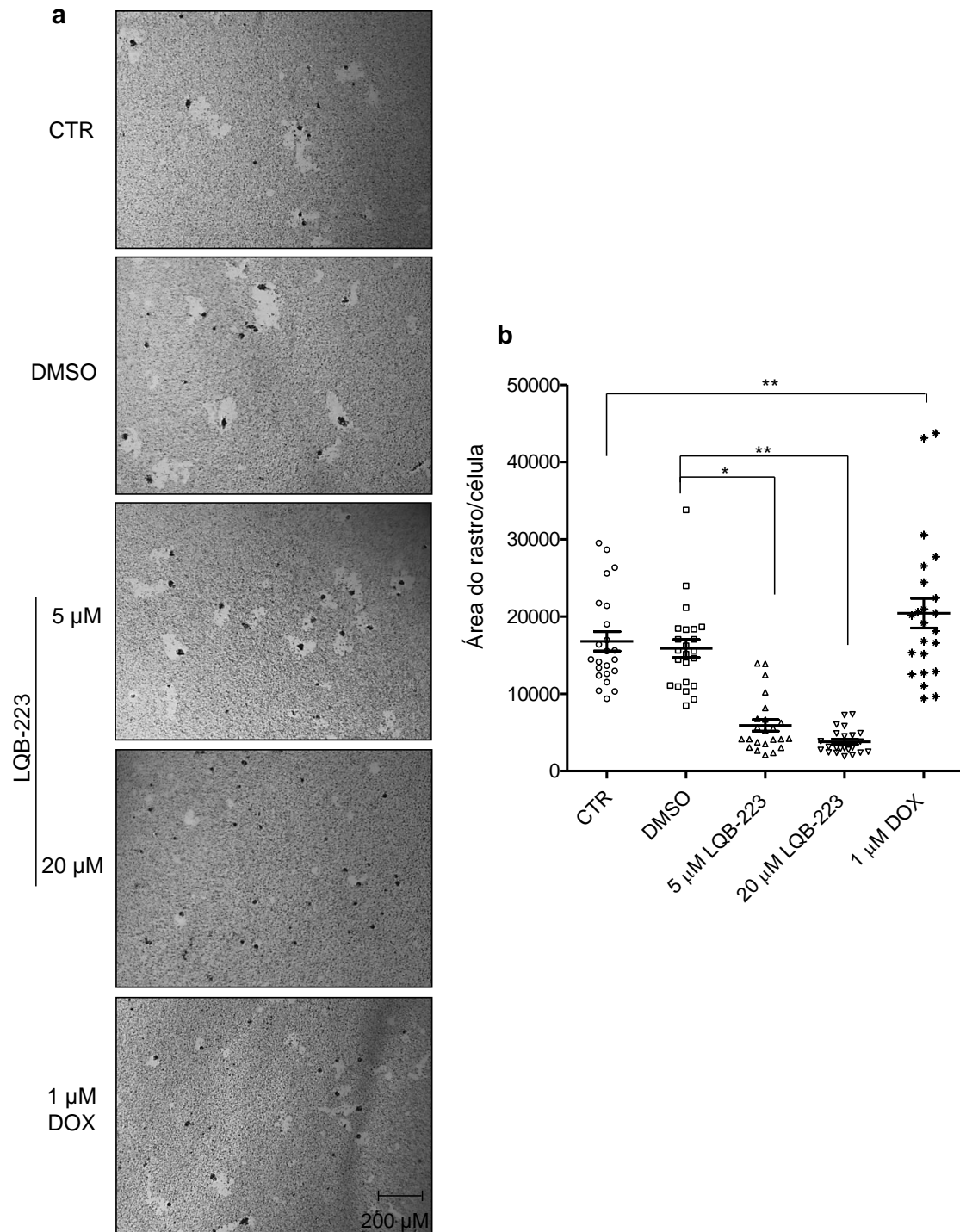


Figura 5.17: Análise da motilidade celular das linhagens MDA-MB-231 após o tratamento com LQB-223. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em placas cobertas com solução de ouro coloidal e tratadas com 5 e 20 μM LQB-223 e 1 μM de DOX durante 24 h. A motilidade das células foi monitorada por microscópio óptico e a medição do rastro formado por cada célula foi feita com auxílio do software ImageJ. As imagens **(a)** e gráficos **(b)** representam três experimentos independentes. (Teste *D'Agostino and Pearson* para avaliar a distribuição amostral com *Wilcoxon* como teste de interferência; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; considerado estatisticamente significativo). CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido, DOX; Doxorrubicina.

5.8 O tratamento com LQB-223 diminui a viabilidade de células MCF-7 e MDA-MB-231 em conformação tridimensional.

Para o entendimento e compreensão dos efeitos citotóxicos em tumores com a conformação tridimensional, foram padronizadas culturas 3D com as células MCF-7 e MDA-MB-231. Para que um aglomerado de células seja considerado uma estrutura 3D é necessário que ele apresente entre 300-500 μm de diâmetro e possua uma linha na borda, que delimite o seu tamanho (Froehlich *et al.*, 2016). Após o plaqueamento e a manutenção em cultura por três dias (dia 0), pudemos observar a formação e o padrão de crescimento de estruturas 3D em ambas as linhagens, que foram mantidas por nove dias em cultura para avaliação dos parâmetros biológicos para toxicidade (Figura **5.18a** e **b**). De acordo com a nomenclatura proposta por Froehlich e colaboradores em 2016, as células MCF-7 foram capazes de formar esferóides, enquanto as células MDA-MB-231 formaram aglomerados celulares compactos (Froehlich *et al.*, 2016). Foi observado também, que os esferóides de MCF-7 não tratados aumentaram o volume ao longo dos dias, enquanto que os agregados de MDA-MB-231 não apresentaram aumento (Figura **5.18a** e **b**).

Nas concentrações de 5 e 20 μM , o tratamento com LQB-223 preveniu o aumento do volume dos esferóides de MCF-7, como avaliado após cinco e nove dias (Figura **5.19a** e **b**). Para a linhagem MDA-MB-231, o tratamento com 20 μM de LQB-223 apresentou uma sutil alteração morfológica após o 9º dia, apresentando um agregado com o centro menos compactado (Figura **5.20a**). Entretanto, não foi possível observar diferença na redução da medida do volume. (Figura **5.20b**).

Para a quantificação da viabilidade celular após o tratamento com LQB-223, foi feita a dosagem da enzima APH para ambas as linhagens após o 9º dia de tratamento. O tratamento dos esferóides de MCF-7 com 5 e 20 μM de LQB-223 diminuiu cerca de 60% a viabilidade celular. O tratamento com a DOX também induziu citotoxicidade acentuada (Figura **5.21a**). Para a linhagem MDA-MB-231, o tratamento com 5 e 20 μM de LQB-223 reduziu, respectivamente, 20 e 40% da viabilidade celular. Para o tratamento com a

DOX, a indução de citotoxicidade nessa linhagem não atingiu significância estatística. (Figura 5.21b).

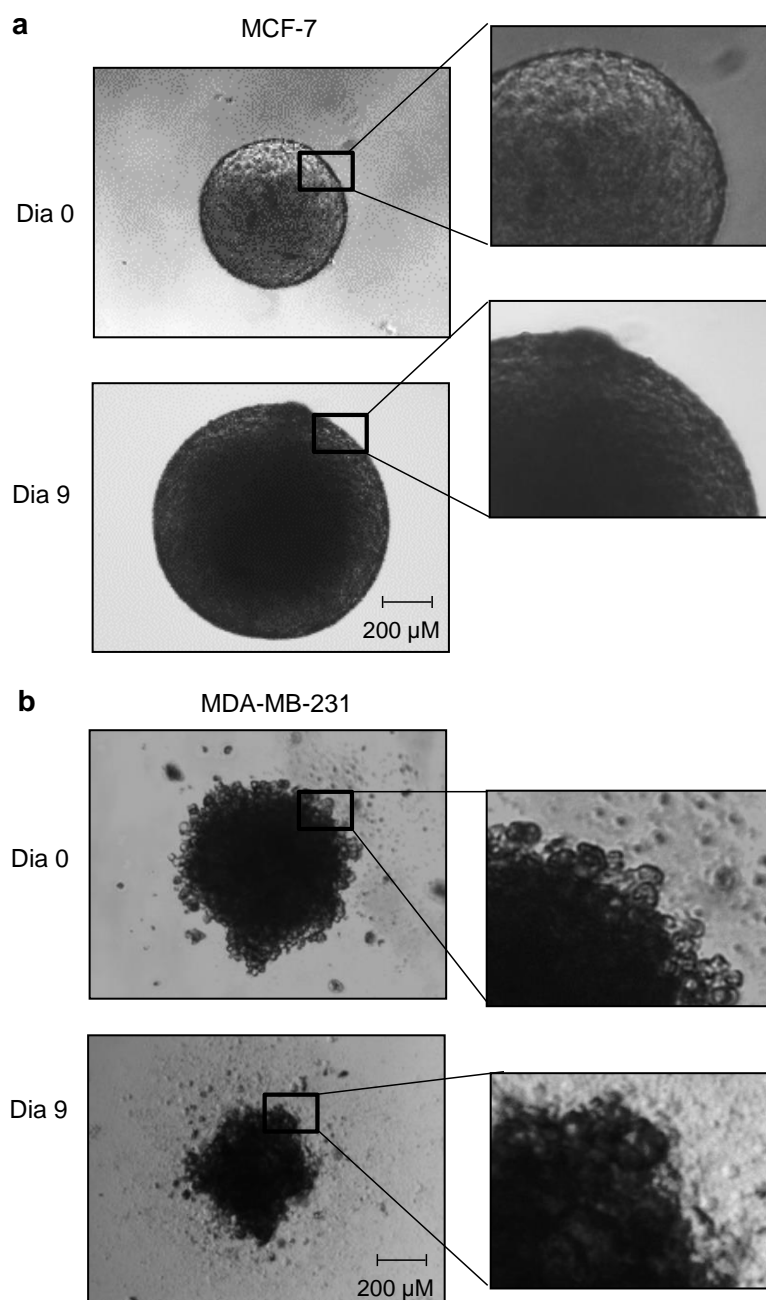


Figura 5.18: Padronização de cultura tridimensional (3D) *in vitro* das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Um total de 2000 células MCF-7 (a) e 6000 MDA-MB-231 (b) foram plaqueadas em placas de 96 poços contendo agarose. Após centrifugação a 2000rpm por 2 min e manutenção por 3 dias em cultura, foi possível observar a formação de estruturas 3D com diâmetro variando entre 200 e 500 μM. Após a sua formação, os agregados foram mantidos em cultura e o volume foi monitorado ao longo de 10 dias. As fotomicrografias são representativas de três experimentos independentes.

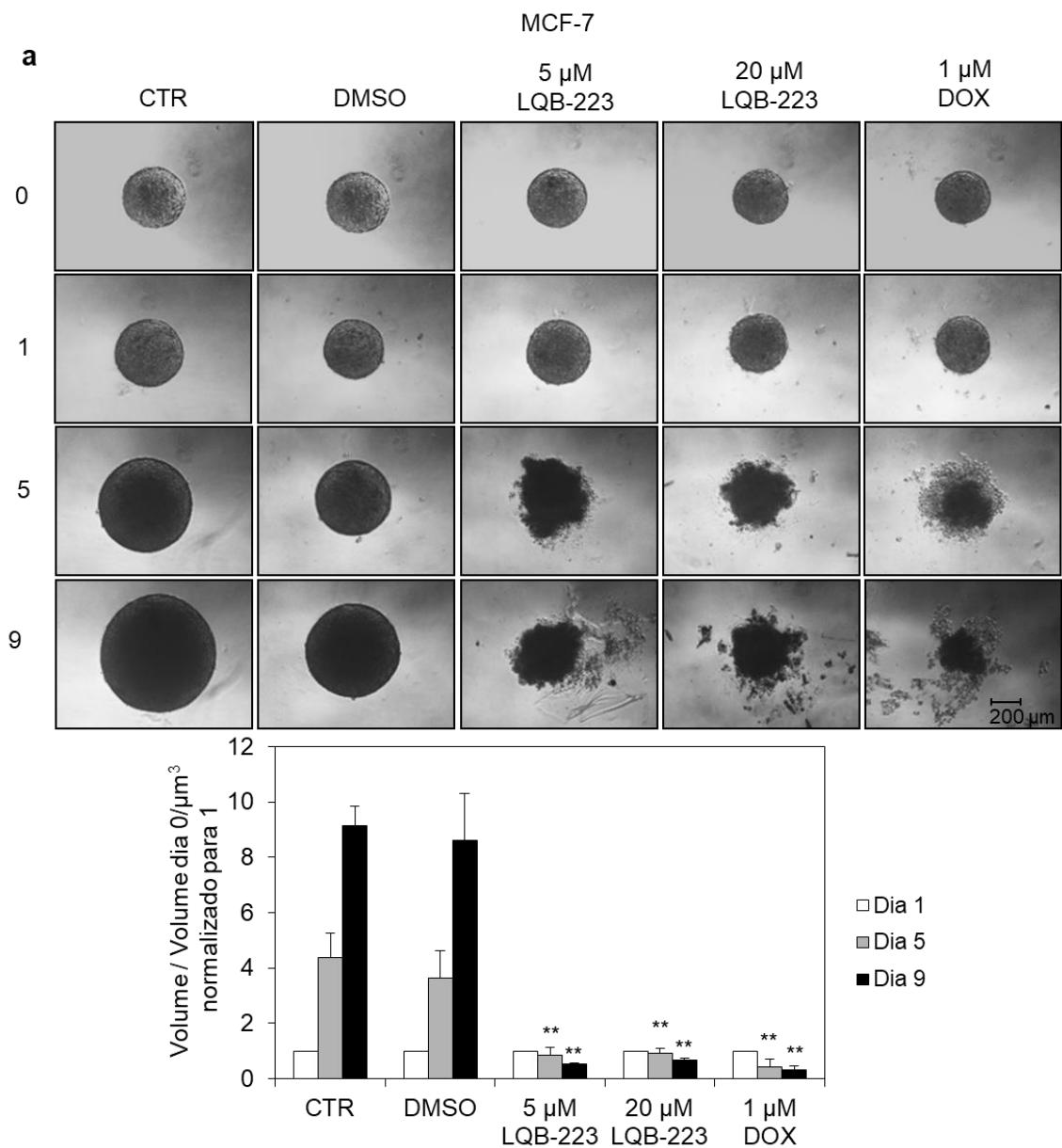


Figura 5.19: Alterações morfológicas em cultura 3D na linhagem celular MCF-7 após o tratamento com o composto LQB-223. As células MCF-7 foram plaqueadas em agarose, centrifugadas e mantidas em cultura por três dias para a obtenção de estruturas 3D. Após formação dos esferóides, foram adicionados à placa 5 e 20 μ M de LQB-223 e 1 μ M DOX. O tratamento foi mantido por 10 dias, dentre os quais foram feitas fotomicrografias nos dias: 0, 1, 5 e 9 para avaliação da morfologia **(a)** e do volume **(b)** dos esferóides. Para calcular o volume dos esferóides, a área foi medida com o auxílio do software ImageJ e foi estabelecida uma relação entre o tamanho observado no dia 0 e os dias subsequentes **(b)**. As fotomicrografias e os gráficos são representativos de três experimentos independentes. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido, DOX; Doxorubicina.

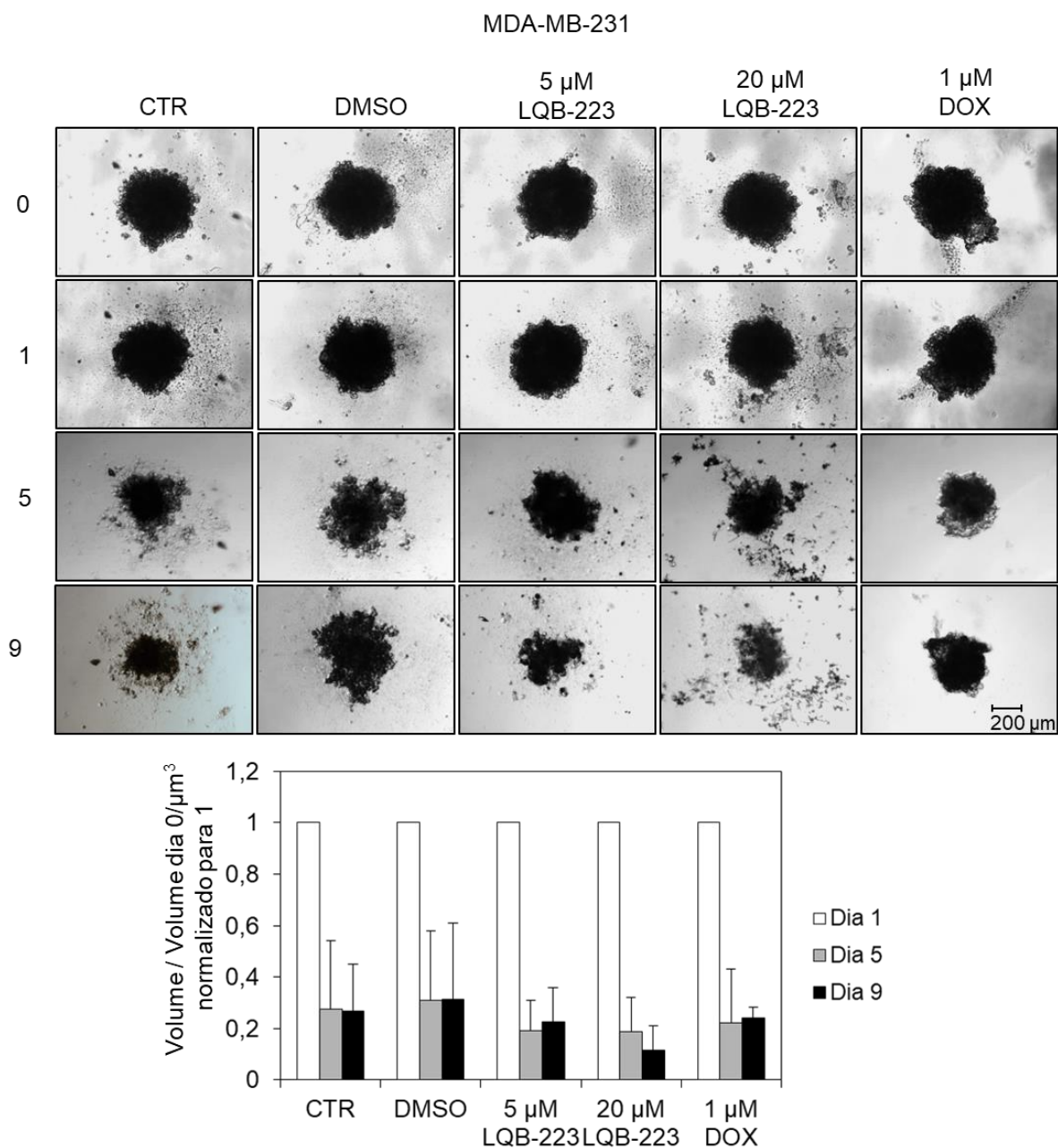


Figura 5.20: Alterações morfológicas em cultura 3D na linhagem celular MDA-MB-231 após o tratamento com o composto LQB-223. As células MDA-MB-231 foram plaqueadas em agarose, centrifugadas e mantidas em cultura por três dias para a obtenção de estruturas 3D. Após formação dos agregados, foram adicionados à placa 5 e 20 μ M de LQB-223 e 1 μ M DOX. O tratamento foi mantido por 10 dias, dentre os quais foram feitas fotomicrografias nos dias: 0, 1, 5 e 9 para avaliação da morfologia (a) e do volume (b) dos agregados. Para calcular o volume dos agregados, a área foi medida com o auxílio do software ImageJ e foi estabelecida uma relação entre o tamanho observado no dia 0 e os dias subsequentes (b). As fotomicrografias e os gráficos são representativos de três experimentos independentes. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfoxido, DOX; Doxorubicina.

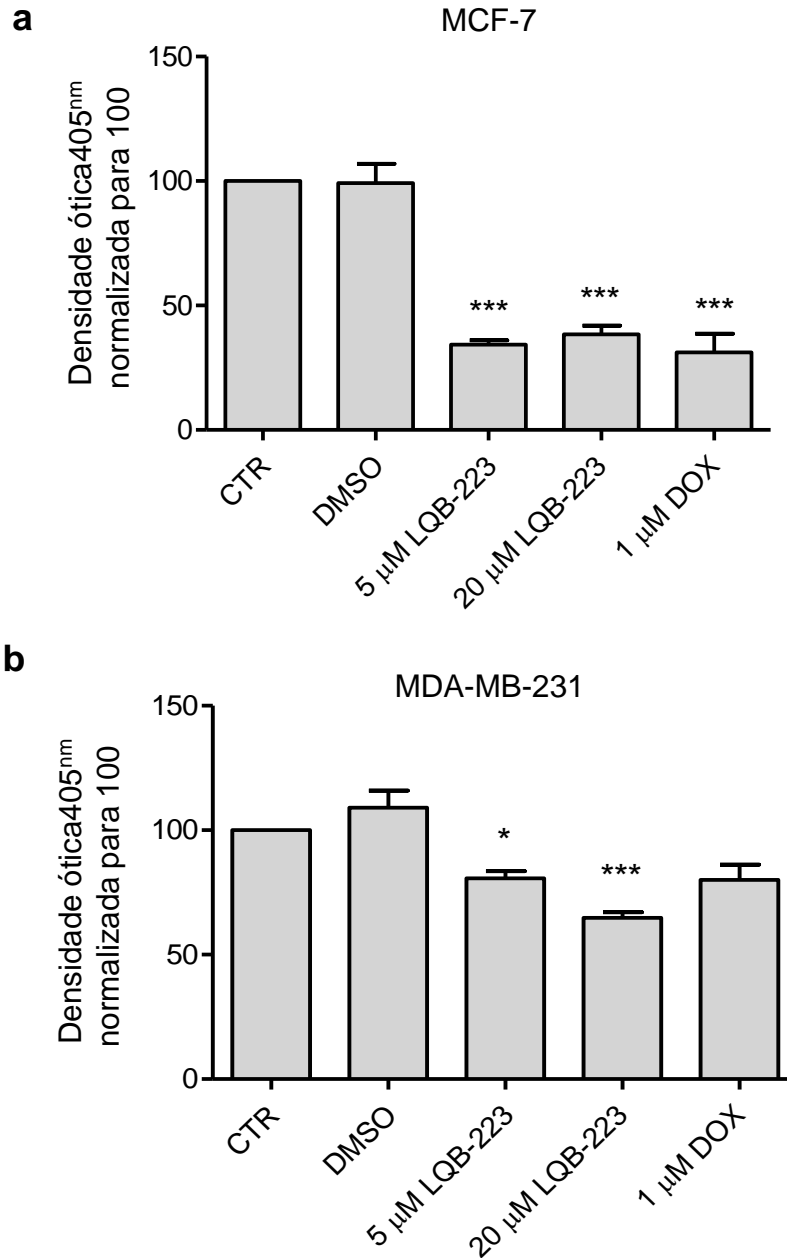


Figura 5.21: Alterações da viabilidade celular induzidas pelo composto LQB-223 em culturas 3D das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231. As células MCF-7 (**a**) e MDA-MB-231 (**b**) foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas em estufa para formação das culturas 3D. Após a formação, as estruturas foram tratadas com 5 e 20 μM de LQB-223 e 1 μM DOX por 10 dias, e foram submetidas ao protocolo de dosagem da fosfatase ácida (APH). A leitura da absorbância foi feita em 405 nm. As células tratadas foram comparadas ao CTR e os valores normalizados para 100%. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes. (Teste *t student*; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; considerado estatisticamente significativo). CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido, DOX; Doxorubicina.

5.9 O tratamento com LQB-223 diminui a taxa migratória de células MCF-7 e MDA-MB-231 em conformação 3D.

Assim como em monocamada, a taxa de migração celular foi avaliada em conformação tridimensional. Para a linhagem MCF-7, houve redução na medida do halo das células em migração após 72 h na concentração de 5 μM de LQB-223. Para o tratamento com 20 μM , houve redução não somente em 72 h, mas também em 48 h (Figura **5.22** e **24a**). Para a linhagem MDA-MB-231, a taxa migratória foi avaliada durante 24 e 48 h, pois quando mantida por mais tempo, as culturas soltavam-se da gelatina, impossibilitando uma medição correta do halo de células em migração. Desta forma, foi verificado que o tratamento com 5 μM de LQB-223 reduziu o halo de células em migração em 48 h e com 20 μM de LQB-223, o efeito foi observado mais precocemente, a partir de 24 h (Figura **5.23** e **24b**). O tratamento com 1 μM DOX não causou efeito na taxa de migração para a linhagem MCF-7, porém para MDA-MB-231, resultou na diminuição da migração em 24 e 48 h (Figura **24a** e **b**). Esses dados indicam a modulação do perfil migratório pelo composto LQB-223 em células de câncer de mama em conformação 3D.

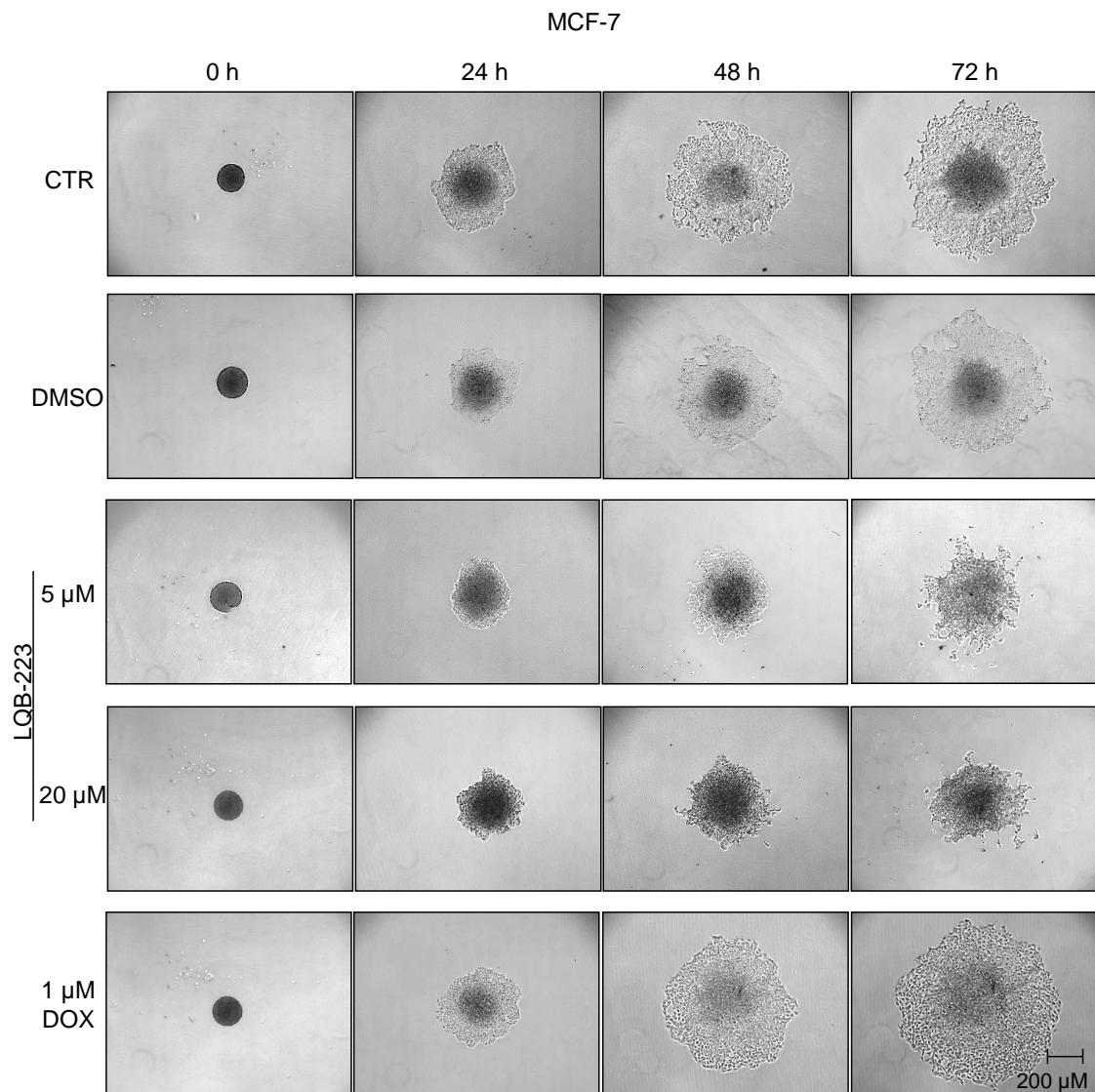


Figura 5.22: Avaliação da taxa de migração celular em culturas 3D na linhagem MCF-7. As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços contendo agarose, centrifugadas e mantidas em estufa por três dias. Após a formação, os esferóides foram transferidos para placas de 24 poços cobertos com 0,1% gelatina e meio de cultura contendo 2% soro fetal bovino. A taxa de migração foi avaliada em 24, 48 e 72 h de tratamento com o composto. As fotomicrografias são representativas de três experimentos independentes. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfóxido, DOX; Doxorubicina.

MDA-MB-231

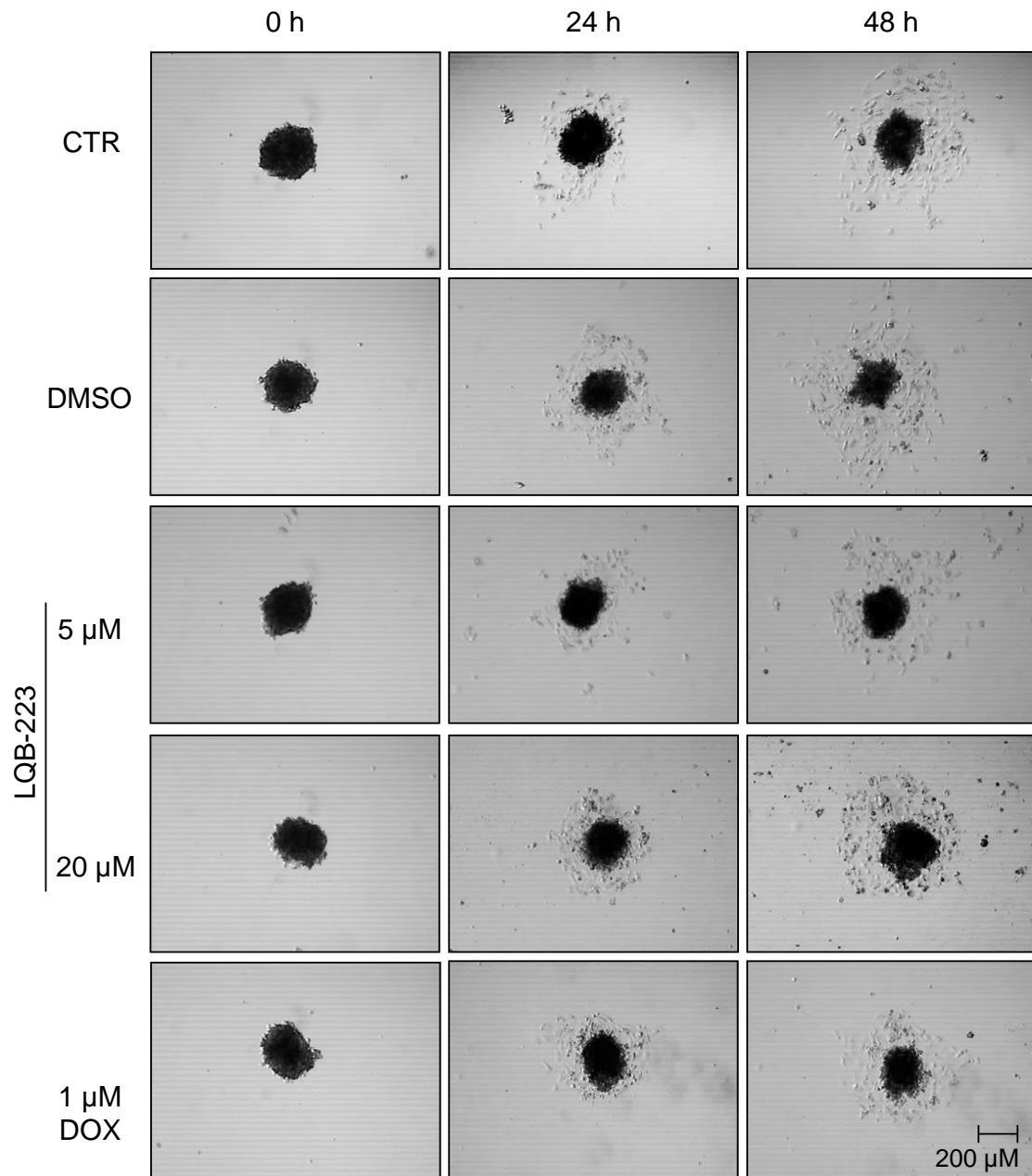


Figura 5.23: Avaliação da taxa de migração celular em culturas 3D na linhagem MDA-MB-231. As células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 96 poços contendo agarose, centrifugadas e mantidas em estufa por três dias. Após formação, os agregados foram transferidos para placas de 24 poços cobertos com 0,1% gelatina e meio de cultura contendo 2% soro fetal bovino. A taxa de migração foi avaliada em 24 e 48 h de tratamento com o composto. As fotomicrografias são representativas de três experimentos independentes. CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfoxido, DOX; Doxorubicina.

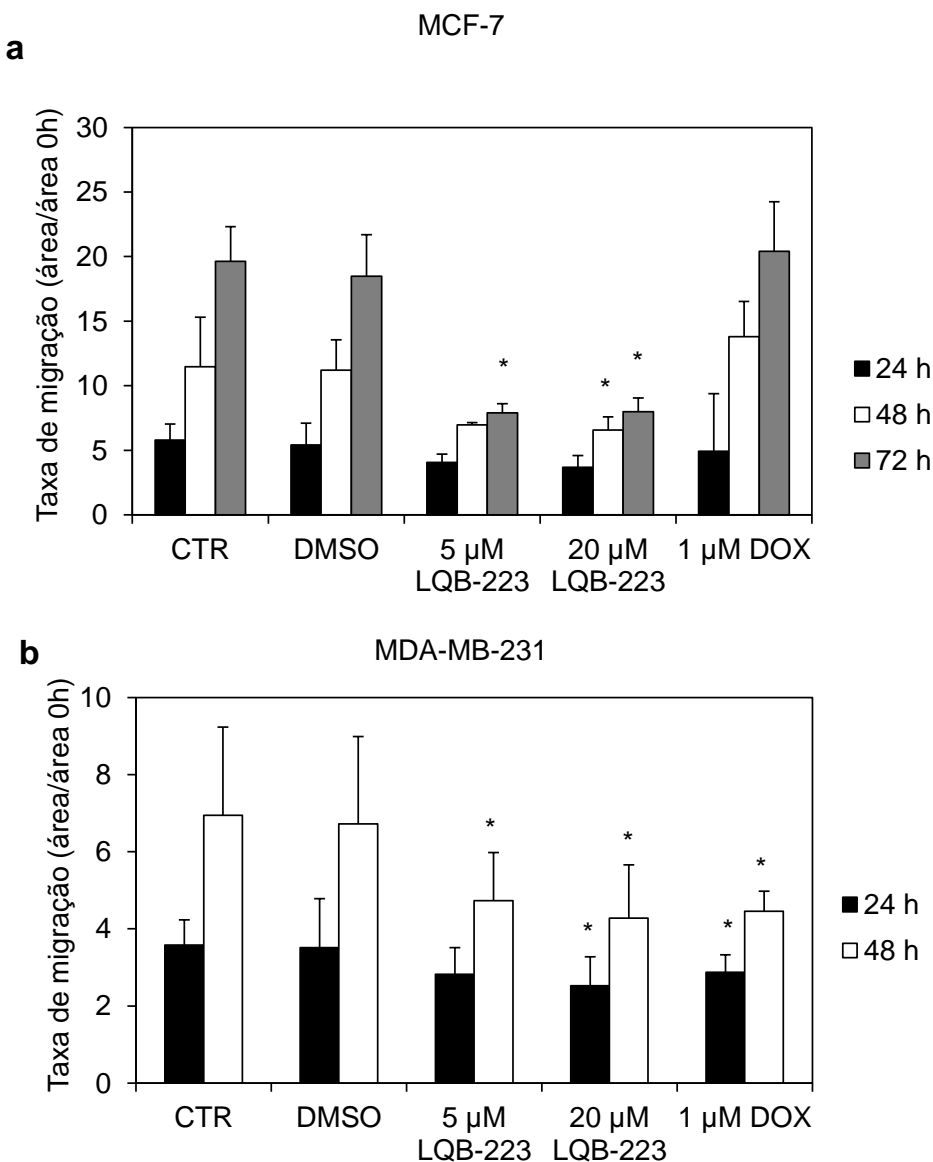


Figura 5.24: Quantificação da taxa de migração celular em culturas 3D das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após o tratamento com LQB-223. As células MCF-7 **(a)** e MDA-MB-231 **(b)** foram plaqueadas em placas de 96 poços contendo agarose, centrifugadas e mantidas por três dias em cultura. Após a formação, as estruturas 3D foram transferidas para placas de 24 poços cobertos com 0,1% gelatina e meio de cultura contendo 2% soro fetal bovino e expostas à 5 e 20 μM LQB-223 e 1 μM de DOX. A quantificação da migração foi realizada com auxílio do software ImageJ (NIH) e a taxa de migração calculada com a seguinte fórmula: Área do halo em 72 h ou 48 h ou 24 h / Área do halo em 0 h. A taxa de migração foi avaliada em 24, 48 ou 72 h de tratamento com o composto. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes. (Teste *t student*, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; considerado estatisticamente significativo). CTR; células não tratadas, DMSO; dimetil sulfoxido, DOX; Doxorubicina.

6. Discussão

O câncer de mama é o tipo tumoral mais incidente entre as mulheres no Brasil e no mundo (INCA, 2018; WHO, 2018). Devido à alta incidência e aos fatores de resistência ao tratamento quimioterápico, também apresenta altas taxas de mortalidade (Longley & Johnson, 2005). Dentre as estratégias para o tratamento do câncer de mama, a quimioterapia baseia-se na administração de antraciclinas associadas aos taxanos ou à ciclofosfamida e fluorouracil, podendo ser utilizada como terapia adjuvante e neoadjuvante (Burnell *et al.*, 2010). Apesar de adequada para o tratamento de pacientes acometidas com câncer de mama, a quimioterapia induz toxicidade para células não tumorais. As antraciclinas, como a DOX, contribuem para indução de cardiotoxicidade nessas pacientes, e os taxanos, como DTX, podem induzir anemia severa, neutropenia e trombocitopenia (Panis *et. al.*, 2011; Murtagh *et al.*, 2016).

Ademais, a resistência a múltiplas drogas contribui para a ineficiência da quimioterapia em cerca de 80 a 90% de pacientes com câncer de mama metastático (Wang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014; Cherdyntseva *et al.*, 2017). Desta forma, a busca por novos compostos com a finalidade de induzir toxicidade para células tumorais, sobrepujar os mecanismos de resistência, e apresentar baixa toxicidade para células não neoplásicas é de grande relevância. Neste contexto, nosso laboratório vem estudando compostos sintéticos promissores, dentre eles o LQB-223. Para melhor compreensão dos efeitos do LQB-223 no câncer de mama, as células MCF-7 e MDA-MB-231, que representam subtipos imunohistoquímicos diferentes, foram utilizadas como modelo. O tratamento induziu citotoxicidade para ambas as linhagens, como avaliado por ensaios de viabilidade celular de longa (clonogênico) e curta (MTT) duração. Comparativamente, a MCF-7 apresentou-se mais sensível ao tratamento com LQB-223, DTX e DOX do que a linhagem MDA-MB-231. Ainda pôde-se verificar que as células responderam de maneira diferenciada ao tratamento, apresentando sensibilidade dependente da concentração e tempo de exposição ao LQB-223. A linhagem MCF-7 exibe um fenótipo que corresponde ao subtipo Luminal A, caracterizado por ser um subtipo menos

agressivo que o subtipo triplo-negativo, representado pela linhagem MDA-MB-231 (Dunnwald *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2016).

Como já descrito, o tratamento com LQB-223 induziu toxicidade em diferentes linhagens neoplásicas, como K562 e com fenótipo de resistência, K562-Lucena e FEPS (linhagens de leucemia mielóide crônica) (Buarque *et al.*, 2014). Para avaliar a toxicidade do tratamento com LQB-223 em células não neoplásicas de mama, foram utilizadas células HB4a, originalmente isoladas de tecido mamário adjacente saudável de uma paciente portadora de câncer de mama (Stamps *et al.*, 1994). Para essas células, o LQB-223 não apresentou toxicidade tão significativa quanto aquela observada após o tratamento com DTX e DOX. Estes resultados corroboram com dados da literatura que demonstraram que o tratamento com 30 nmol/L de DOX induziu a diminuição da proliferação de células HB4a após 72 h (Trapé *et al.*, 2012). Para esta mesma linhagem, a intensa exposição ao tratamento com DTX ocasionou alterações transcricionais no DNA, apresentando superexpressão de genes envolvidos na apoptose (dos Santos *et al.*, 2009). Além disso, células de esplenócitos (Linfócitos B e T) de camundongos saudáveis Swiss foram tratadas com 10 mM de LQB-223, dose bastante superior à utilizada em nosso estudo, e foi verificado que a exposição ao composto não apresentou toxicidade para essas células (Buarque *et al.*, 2014). Dados do nosso laboratório revelaram que a exposição de linfócitos de indivíduos saudáveis a 20 μ M de LQB-223 também não resultou em efeito tóxico, como aferido também pelo ensaio de MTT (dados não publicados). Com base nessas informações, o tratamento com as drogas comumente usadas na clínica oferece toxicidade mais significativa para células não neoplásicas em comparação com o tratamento com LQB-223. Assim, podemos sugerir que o composto LQB-223 apresenta ação citotóxica preferencial para células neoplásicas.

Previamente a este estudo, foi demonstrado que o tratamento de células leucêmicas com LQB-223 induziu parada no ciclo celular na fase G2/M (Buarque *et al.*, 2014). As proteínas reguladoras do ciclo celular, como Rb, complexos ciclinas-CDKs, têm sido amplamente estudadas, já que estão relacionadas com a proliferação tumoral (Alexander *et al.*, 2017). O tratamento

das células MCF-7 com 5 μM de LQB-223 levou a um aumento do percentual de células em G2/M e após 72 h, em G1. Este efeito pode estar relacionado aos mecanismos de reparo aos danos causados pelo LQB-223 em baixas concentrações, promovendo um retorno das células ao ciclo celular. Quando as células foram tratadas com 20 μM de LQB-223, a parada em G2/M foi também observada e se manteve até 72 h. Houve também, nesta condição, um aumento de células em sub-G0, fase que reflete o conteúdo de DNA em fragmentação. Estes dados corroboram com o observado por Buarque e colaboradores em células de leucemia, que permaneceram paradas na fase G2/M do ciclo celular após 24 h de incubação com 2,5 μM de LQB-223. Com percentuais acerca de 35%, as células paradas em G2/M mantiveram o perfil por 48 h, sendo que em 72 h, foi observada massiva fragmentação, com mais de 30% de células (Buarque *et al.*, 2014). De forma semelhante, o tratamento com 20 μM de LQB-223 apresentou parada no ciclo celular da linhagem MDA-MB-231, exibindo aproximadamente 65% de células paradas em G2/M. Ao longo de 48 e 72 h de tratamento, o percentual de células paradas reduziu para 40 e 30%, respectivamente. O mesmo perfil de distribuição de fases foi observado após o tratamento com 100 nM de DTX. Também foi observado que o tratamento em tempos mais prolongados pode levar à presença de células hiperdiploides (apontado por setas na Figura **5.7b**), o que também foi observado mediante o tratamento com LQB-223 em células de leucemia FEPS e K562 (Buarque *et al.*, 2014). Apesar de evidenciado apenas por citometria de fluxo e tendo ainda que ser melhor caracterizado por cariotipagem, o evento da hiperploídia pode estar ocorrendo por perdas cromossômicas resultantes de uma incorreta separação mitótica. Este evento é frequente em tumores de mama ductais e culminam com aberrações cromossômicas (Molist *et al.*, 2005). Os taxanos agem ligando-se à β -tubulina, o que culmina com a estabilidade no fuso mitótico, inibindo a separação das cromátides irmãs e cromossomos homólogos, resultando em hiperploídia (Bayet-Robert *et al.*, 2010). Foi também demonstrado que o LQB-223 interage com resíduos de DNA o que leva, indiretamente, à ativação de mecanismos envolvidos com a fragmentação do DNA (Silva *et al.*, 2017). Para a linhagem MCF-7 o tratamento com 20 μM de LQB-223 aumentou cerca de 20% o percentual de células em sub-G0. Em

comparação, o tratamento com 100 nM de DTX resultou em distribuição do ciclo celular semelhante à observada no tratamento com 20 μ M de LQB-223. O tratamento de células tumorais de mama com a concentração de 100 nM de DTX causa parada no ciclo celular na fase G2/M (Hernandez-Vargas *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2012). Para compreender a complexidade da regulação do ciclo celular pelo tratamento com agentes antineoplásicos, é necessário também o estudo das proteínas reguladoras da divisão celular, tais como a p53 e p21. A proteína p53 ativa a transcrição gênica de p21 que, por sua vez, age como uma reguladora universal dos complexos ciclinas-CDKs (Xiong *et al.*, 1993). Durante a fase G1/S a proteína p21 liga-se ao complexo CDK2-ciclina E e inibe sua atividade, e o início da fase S, levando à parada na fase G1 (Xiong *et al.*, 1993; Boulaire *et al.*, 2000). Na fase G2/M, as proteínas p53 e p21 são essenciais para o controle do ponto de checagem desta fase, promovendo uma parada na fase G2 mediante a um dano ao DNA (Bunz *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2015). Assim, observamos que o tratamento com LQB-223 modulou os níveis protéicos de p53 e p21 nas células MCF-7, que exibem o gene *TP53* selvagem, codificando uma proteína funcional. Diferentemente, não ocorreu modulação da expressão dessas proteínas nas células MDA-MB-231, que apresentam mutação no gene *TP53*. As células MDA-MB-231 apresentam a proteína funcional p73, que pode assumir parcialmente as funções da p53 quando esta se encontra mutada ou quando não está funcional (Vayssade *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2017). Estes dados sugerem que a parada no ciclo celular na fase G2/M mediante o tratamento com LQB-223 pode ocorrer de forma independente da expressão ou funcionalidade da proteína p53.

Outras importantes proteínas que regulam o ciclo celular, FOXM1 e Survivina, apresentaram níveis protéicos aumentados após 24 h de tratamento com LQB-223. Wang e colaboradores demonstraram por imunoprecipitação de cromatina que a expressão do fator de transcrição FOXM1 é necessária para a transcrição de Aurora B quinase, Survivina e a proteína A e B do centrômero (CENPA e CENPB), proteínas essenciais para a formação do complexo cromossomal (CPC: *chromosomal passenger complex*) (Wang *et al.*, 2015). Alterações em quaisquer dessas proteínas, podem ocasionar problemas na segregação cromossomal e gerar instabilidade genômica (Ruchaud *et al.*,

2007; Kitagawa & Lee, 2015). A superexpressão de FOXM1 está associada a mutações em p53, degradação da proteína p21 e ativação de vias de proliferação celular como PI3/Akt (Saba *et al.*, 2016). A Survivina, além de reguladora da apoptose, é requerida durante a divisão celular compondo o complexo cromossomal (Li *et al.*, 1998; Altieri, 2003). Além disso, devido à função que a Survivina e FOXM1 desempenham na progressão do ciclo celular, as células paradas na fase G2/M podem refletir em um acúmulo dessas proteínas oncogênicas (Wang *et al.*, 2015; Kitagawa & Lee, 2015). Dessa forma, sugerimos que a parada no ciclo celular em G2/M observada após o tratamento com LQB-223 pode estar intimamente relacionada ao aumento dos níveis proteicos de FOXM1 e Survivina em 24 h. Experimentos de inibição gênica dessas proteínas podem ser elucidativos quanto aos mecanismos de atuação do composto LQB-223.

Os dados referentes à indução de citotoxicidade mediada pelo LQB-223, observados a partir do ensaio de MTT, não foram compatíveis com os resultados obtidos na avaliação da fragmentação. O ensaio de MTT avalia a capacidade celular de metabolizar os cristais de MTT em cristais de formazan, não refletindo diretamente morte celular (Mosmann, 1983). Porém, houve aumento de células marcadas com anexina V/PI ao tratamento com LQB-223. Para melhor entender qual tipo de morte estaria envolvida na toxicidade do LQB-223, foram avaliados níveis de pro-caspases. As pro-caspases representam formas inativas e são ativadas mediante clivagem proteolítica, dando origem às caspases (Parrish *et al.*, 2013). Devido à diminuição das procaspases -3, -7 e -9, sugere-se que o tratamento induziu a via intrínseca da apoptose por ativação de caspases efetoras e iniciadoras (Ow *et al.*, 2008; Zamaraev *et al.*, 2017). O conjunto desses dados sugere que o LQB-223 induziu morte celular por ativação da via intrínseca da apoptose intermediada por caspases. O tratamento de MCF-7 e MDA-MB-231 com LQB-223 também resultou na redução das proteínas inibidoras da apoptose XIAP, c-IAP1 e Mcl-1. A superexpressão dessas proteínas está associada a tumores mais resistentes e com grau histológico mais avançado (Wang *et al.*, 2012). Por este motivo, novos compostos e estratégias terapêuticas promissoras têm por objetivo a elucidação da modulação dessas proteínas. Outros trabalhos

mostraram que as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com YM155, um inibidor da Survivina em estudo clínico de fase I/II, também inibiu a XIAP, levando as células à autofagia (Cheng *et al.*, 2015). Paschall e colaboradores mostraram que doses subletais de LCL85, um composto análogo à ceramida, inibiu XIAP e c-IAP-1, induziu apoptose em células MDA-MB-231 e suprimiu o crescimento tumoral *in vivo* (Paschall *et al.*, 2014). A amplificação do gene que codifica a proteína Mcl-1 foi encontrada em 54% dos tumores do subtipo triplo-negativo após a quimioterapia neoadjuvante (Balko *et al.*, 2014). A inibição desta proteína com a combinação de lapatinib e obatoclax resultou em morte de células MCF-7 e reduziu o volume de tumores de mama em camundongos. (Mitchell *et al.*, 2010). Levando-se em conta que a superexpressão de proteínas antiapoptóticas é um mecanismo clássico de indução de resistência, novos compostos que sejam capazes de sensibilizar células neoplásicas através da modulação negativa dessas vias de sinalização, como o LQB-223, se fazem cruciais.

Evidências crescentes apontam para a interrelação do fenótipo de resistência a drogas e a aquisição de características migratórias e invasivas em neoplasias (Karlsson *et al.*, 2017). Diante desse contexto, a capacidade migratória é um importante evento a ser avaliado, pois células tumorais apropriam-se desta estratégia para colonizar diferentes tecidos (Cejalvo *et al.*, 2017). Foi observado que o tratamento com LQB-223 reduziu a taxa migratória e a motilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231 após 24 h. Estes achados corroboram com os dados obtidos na avaliação da expressão proteica, pois a redução dos níveis proteicos de Mcl-1 XIAP e cIAP1 em 48 h, podem estar contribuindo para a aquisição de um fenótipo mais epitelial dessas células. A proteína Mcl-1 tem sido associada à resistência aos quimioterápicos e a um prognóstico desfavorável em câncer de mama. Por este motivo, têm sido propostos compostos que inibem farmacologicamente esta proteína. Antagonistas de Mcl-1, como miméticos de BH3 isoladamente ou em combinação com o dasatinib, inibiram a invasão e progressão de tumores triplo-negativos *in vivo* e *in vitro* por meio da avaliação de células MDA-MB-231 (Young *et al.*, 2016). Essas células, quando tratadas com ácido anacárdico (AA) apresentaram diminuição dos níveis proteicos de Mcl-1, vimentina e MMP-

9 e, em contrapartida, aumento da expressão de E-caderina, mostrando sua capacidade de reverter o fenótipo mesenquimal de células triplo-negativas (Zhao *et al.*, 2018). Trabalhos demonstraram que a XIAP também está envolvida na progressão tumoral e metástase. Em amostras de pacientes, foram detectados altos níveis de XIAP associados ao comprometimento de linfonodos em tumores de mama inflamatório com grau histológico 3 (Evans *et al.*, 2018). De forma consistente, a inibição de XIAP em células tumorais de mama enxertadas no tecido gorduroso mamário de camundongos mostrou-se efetiva na diminuição da proliferação e motilidade de células tumorais (Evans *et al.*, 2018). Em outro trabalho, foi demonstrado que o tratamento com Embelin, um inibidor da XIAP, inibiu o potencial migratório após redução da expressão de XIAP em células MCF-7 (Sumalatha *et al.*, 2014.) O aumento da motilidade celular é característica de células tumorais, requerida para que as células evadam de seus tecidos originais e colonizem outros sítios, ocasionando metástases (Talmadge *et al.*, 2010; Wells *et al.*, 2013). Desta forma, o estudo de compostos que inibem a motilidade celular apresenta grande importância terapêutica. Neste trabalho, demonstramos que o tratamento com LQB-223 diminui a motilidade celular de MCF-7 e MDA-MB-231 em diferentes concentrações.

Em contrapartida, o tratamento das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 com 1 μ M de DOX não reduziu as taxas de migração e motilidade celular após exposição de 24 h a este quimioterápico. A DOX é uma antraciclina utilizada como primeira linha do tratamento quimioterápico do câncer de mama, oferecendo citotoxicidade mediada por estresse oxidativo e inibição da topoisomerase II (Sawyer, 2013; Vejpongsa & Yeh, 2014). Apesar de sua eficiência, a DOX apresenta efeitos cardiotoxícos para as pacientes submetidas ao tratamento (Kuzmicic *et al.*, 2011). Estudos apontam que o tratamento isolado com DOX na concentração de 4 μ g/mL pode aumentar os níveis de CXCR4, quimiocina altamente expressa por células de câncer de mama em processos de metástase (Mahjoub *et al.*, 2017). A complexação da CXCR4 com seu ligante CXCL12 regula a migração e motilidade celular (Müller *et al.*, 2001). Portanto, com a finalidade de potencializar os efeitos da DOX, novas estratégias propõem o tratamento com baixas concentrações de DOX em

combinação com outros compostos naturais ou que não ofereçam toxicidade adicional. Em combinação com a curcumina, o tratamento com DOX levou à redução da migração celular de células MDA-MB-231, diminuindo os níveis de RNAm de CXCR4 (Mahjoub *et al.*, 2017). Também foi demonstrado que doses muito baixas de DOX, 0,1 μ M, levaram a um aumento da invasão e migração de células MDA-MB-231. Essa concentração em combinação com o composto furanodieno reduziu a migração e invasão dessas células, mediada por diminuição dos níveis de expressão de MMP-9 (Zhong *et al.*, 2018).

Para o entendimento dos efeitos citotóxicos do LQB-223 em tumores sólidos, foram padronizadas culturas 3D com as células MCF-7 e MDA-MB-231. De acordo com a nomenclatura proposta por Froehlich e colaboradores, as células MCF-7 são capazes de formar esferóides, enquanto as células MDA-MB-231 formam aglomerados compactos (Froehlich *et al.*, 2016). A diferença entre os tipos de estrutura 3D pode ser atribuída a diferentes perfis de expressão de moléculas envolvidas com a adesão e com o processo de TEM. Dados apontaram que, comparada à MCF-7, a linhagem MDA-MB-231 apresenta elevados níveis de marcadores mesenquimais, como vimentina, N-caderina e twist e, em contrapartida, redução de proteínas envolvidas com características epiteliais como E-caderina, o que limita a habilidade de originar esferóides bem compactados (Yang *et al.*, 2013; Dubois *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). Isso vai ao encontro do perfil invasivo e metastático amplamente atribuído à linhagem MDA-MB-231 na literatura, quando comparada à MCF-7 (Dai *et al.*, 2017).

A avaliação de células em conformação 3D é uma importante ferramenta que permite compreender o efeito de compostos antitumorais em uma arquitetura mais parecida com um tumor sólido (Sarisozen *et al.*, 2014). A cultura tridimensional oriunda das mesmas células avaliadas em monocamada apresenta-se mais resistente ao tratamento. Isto ocorre devido a sua estrutura, pois os nutrientes e demais substratos dispersos no meio de cultura são encaminhados por difusão para as células localizadas mais internamente (Koshkin *et al.*, 2017). Portanto, foram utilizadas para o tratamento dessas culturas concentrações até dez vezes maiores que a utilizada em monocamada. Em concentrações crescentes de 5, 10, 20, 50, 100 e 200 μ M de

LQB-223, as culturas foram avaliadas durante nove dias de tratamento e tiveram o volume aferido em dias específicos. O tratamento das linhagens com 50, 100 e 200 μM resultou na formação de precipitados no meio de cultura, provavelmente devido ao excesso de LQB-223, formando cristais (dados não mostrados). Essas concentrações não foram utilizadas para os experimentos posteriores. O tratamento com 5 e 20 μM de LQB-223 resultou na redução da viabilidade celular para ambas as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após 9 dias de exposição. Em monocamada, esses efeitos são observados mais precocemente, em 48 ou 72 h após exposição ao LQB-223. Estudos vêm demonstrando que o tratamento de células cultivadas em monocamada superestima o efeito dos quimioterápicos (Vinci *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). Como exemplo disto, células BT474 e MCF-7 em conformação 3D foram mais resistentes ao tratamento com paclitaxel e adriamicina que as células em monocamada, apresentando menor expressão protéica de PARP e caspase-3 após o tratamento (Imamura *et al.*, 2015). Células MDA-MB-231 e SUM1315 em conformação 3D foram mais resistentes ao tratamento com cisplatina, e docetaxel que as células cultivadas em monocamada. A resistência ao tratamento pode estar associada à capacidade de metabolização celular e neste trabalho, foi demonstrado que células MDA-MB-231 em conformação 3D apresentaram menor metabolização da resazurina que as células em monocamada (Dubois *et al.*, 2017). Considerando a maior capacidade de células tumorais desenvolverem resistência a drogas quando cultivadas em conformação tridimensional, nossos dados tangendo os efeitos do composto LQB-223 ressaltam a sua capacidade citotóxica para células de câncer de mama.

Posteriormente, verificamos a habilidade de migração celular em conformação 3D e observamos a redução do seu perfil mediante o tratamento com 5 e 20 μM de LQB-223 para ambas as linhagens. O efeito na redução da migração atingiu significância estatística a partir de 48 h de exposição. Como mencionado no parágrafo anterior, o efeito observado nas culturas 3D mais tardio que o tratamento das células em monocamada pode estar associado à maior resistência observada nessa conformação. Estudos vêm demonstrando que eventos associados à transição epitélio-mesênquima podem estar

associados ao tipo de cultura utilizada em cada estudo. Em culturas tridimensionais, dependendo do tamanho e tempo de cultivo, são encontrados diferentes microambientes, o que pode contribuir com um fenótipo mais mesenquimal (Kim *et al.*, 2014). Kim e colaboradores mantiveram células MCF-7 e MDA-MB-231 em cultura tridimensional por 30 dias, e demonstraram que no 8º dia as culturas apresentaram diferentes regiões e centro necrótico. Ao avaliarem a expressão de Snail em cortes de parafina constataram a marcação mais proeminente na região central do esferoide. Estes achados sugerem que a expressão de Snail está associada ao estresse metabólico causado por hipóxia e depleção de glicose (Kim *et al.*, 2014). A hipóxia promove migração e metástase de células de câncer de mama, via indução da expressão do fator de transcrição HIF-1 α (Wang *et al.*, 2018). Foi demonstrado que as células sob essa condição estão localizadas na região central do tumor e, em contrapartida, as células metastáticas encontram-se na superfície do tumor, em regiões de normóxia, evidenciando perfis distintos de hipóxia em células que estão em diferentes microambientes (Wang *et al.*, 2018). Neste trabalho também demonstramos que o tratamento com DOX não reduziu a taxa migratória de células MCF-7 em conformação tridimensional. Porém para a linhagem MDA-MB-231 nesta conformação, o tratamento com DOX levou à redução da taxa migratória das células. Os efeitos observados nos ensaios com as culturas tridimensionais sugerem que a DOX apresenta efeitos citotóxicos diferenciados para ambas as linhagens, induzindo citotoxicidade para as células MCF-7 e reduzindo a taxa migratória das células MDA-MB-231.

Com base nestes achados, a investigação dos efeitos do tratamento do LQB-223 representa uma promissora estratégia na terapia de tumores de mama de diferentes fenótipos. Entretanto, a investigação acerca dos mecanismos de ação envolvidos na citotoxicidade, migração e motilidade celular, bem como a compreensão dos efeitos desse composto em combinação com as drogas utilizadas na quimioterapia ainda são relevantes questões a serem exploradas.

Em conjunto, esses resultados apontam o LQB-223 como um promissor composto antitumoral para linhagens de mama de diferentes subtipos tumorais. De forma consistente, foi verificado que o LQB-223 promove citotoxicidade e

reduz eventos associados à metástase em culturas 2D e 3D, sendo considerado um composto importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que devem ser melhor elucidadas em ensaios *in vivo*, modelos mais complexos para o estudo de novas drogas.

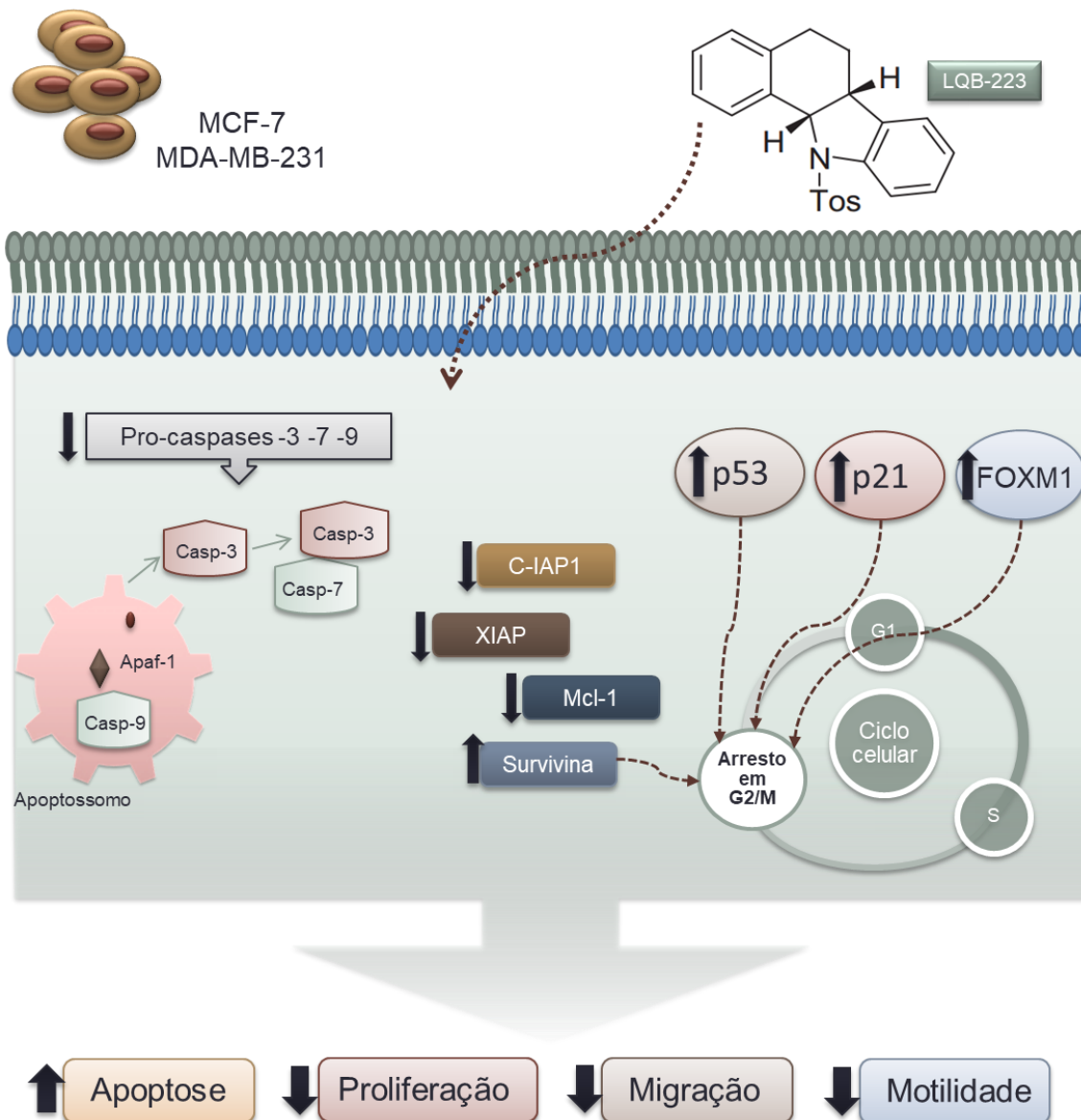


Figura 6.1: Mecanismos desencadeados pelo tratamento com o composto LQB-223 nas células MCF7 e MDA-MB-231. O tratamento das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 com LQB-223 inibiu a viabilidade, proliferação e induziu morte celular por apoptose mediada pelas caspases-3, -7 e -9. Mediante o estímulo apoptótico, houve diminuição dos níveis das proteínas antiapoptóticas c-IAP1, XIAP, Mcl-1 e Survivina. Além disso, após o tratamento com o composto LQB-223 foi observada redução dos níveis proteicos de p53, p21 e do fator de transcrição FOXM1 simultaneamente à parada no ciclo celular na fase G2/M. O LQB-223 também reduziu as taxas migratórias e motilidade celular de ambas as linhagens. Os efeitos na viabilidade celular e migração também puderam ser observados no tratamento das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 em estruturas tridimensionais.

7. Conclusões

- ❖ O composto LQB-223 inibe a viabilidade celular e reduz a formação de colônias em linhagens celulares de câncer de mama de diferentes subtipos molecular;
- ❖ O tratamento com o composto LQB-223 induz menor toxicidade para células não neoplásicas de mama que o tratamento com DOX e DTX, sugerindo que o LQB-223 possui efeito preferencial para células neoplásicas;
- ❖ O composto LQB-223 induz parada na fase G2/M em linhagens com diferentes *status* de p53.
- ❖ O efeito citotóxico observado após o tratamento com o composto LQB-223 envolve a ativação da cascata apoptótica e modulação das proteínas FOXM1, Survivina, XIAP, c-IAP1 e Mcl-1;
- ❖ A exposição ao LQB-223 inibe a taxa de migração, bem como a motilidade de células de câncer de mama, indicando que este composto pode também influenciar processos importantes para a progressão tumoral;
- ❖ O composto LQB-223 inibe a viabilidade e a migração em células de câncer de mama cultivadas em conformação tridimensional, modelo mais resistente e similar aos tumores sólidos *in vivo*.

8. Perspectivas

- ❖ Investigar a modulação da expressão das proteínas envolvidas na transição epitélio-mesênquima nas células de câncer de mama em cultura 2D e 3D tratadas com LQB-223;
- ❖ Investigar o papel das proteínas envolvidas com a apoptose, proliferação e transição epitélio-mesênquima nos efeitos mediados pelo LQB-223 em câncer de mama, através de ensaios funcionais de indução de silenciamento e superexpressão.
- ❖ Estabelecer co-culturas com células neoplásicas de mama e não neoplásicas em conformação 3D, para avaliar os efeitos citotóxicos do LQB-223;
- ❖ Avaliar o efeito da combinação de LQB-223 com doses subletais de DTX e DOX na citotoxicidade e no padrão de expressão das proteínas envolvidas na apoptose, proliferação e transição epitélio-mesênquimal em células de câncer de mama;
- ❖ Avaliar os efeitos antitumorais do tratamento com o composto LQB-223 em modelo de câncer de mama triplo-negativo *in vivo*, e na modulação das vias associadas à resistência, migração e metástase.

9. Referências Bibliográficas

Abadía-Molina F, Morón-Calvente V, Baird SD, Shamim F, Martín F, MacKenzie A. (2017). Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) localizes to the cytokinetic machinery during cell division. *Sci Rep.* Jan 6;7:39981.

Adamkov, M., Kajo, K., Vybohova, D., Krajcovic, J., Stuller, F., and Rajcani, J. (2012). Correlations of survivin expression with clinicomorphological parameters and hormonal receptor status in breast ductal carcinoma. *Neoplasma* 59, 30–37.

Ahmad A., Z. Wang, D. Kong, S. Ali, Y. Li, S. Banerjee, R. Ali, F.H. Sarkar. (2010) FoxM1 down-regulation leads to inhibition of proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through the modulation of extra-cellular matrix degrading factors, *Breast Cancer Res. Treat.* 122 337–346.

Ahn H, Sim J. (2015) Increased expression of forkhead box M1 is associated with aggressive phenotype and poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *J Korean Med Sci.* 30(4):390–7.

Aktas, H., Cai, H., and Cooper, G.M. (1997). Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3850–3857.

Albrecht-Buehler, G. (1977) The phagokinetic tracks of 3T3 cells. *Cell* 11, 359–404.

Alexander, A., Karakas, C., Chen, X., Carey, J.P.W., Yi, M., Bondy, M., Thompson, P., Cheung, K.L., Ellis, I.O., Gong, Y., et al. (2017). Cyclin E overexpression as a biomarker for combination treatment strategies in inflammatory breast cancer. *Oncotarget* 8, 14897–14911.

Alfaro, Y., Delgado, G., Cárabez, A., Anguiano, B., and Aceves, C. (2013). Iodine and doxorubicin, a good combination for mammary cancer treatment: antineoplastic adjuvancy, chemoresistance inhibition, and cardioprotection. *Mol. Cancer* 12, 45.

Ali, N.M., Yeap, S.K., Abu, N., Lim, K.L., Ky, H., Pauzi, A.Z.M., Ho, W.Y., Tan, S.W., Alan-Ong, H.K., Zareen, S., et al. (2017). Synthetic curcumin derivative DK1 possessed G2/M arrest and induced apoptosis through accumulation of intracellular ROS in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Cell Int.* 17, 30.

Ali, S.M., Watson, J., Wang, K., Chung, J.H., McMahon, C., Ross, J.S., and Dicke, K.A. (2016). A Combination of Targeted Therapy with Chemotherapy Backbone Induces Response in a Treatment-Resistant Triple-Negative MCL1-Amplified Metastatic Breast Cancer Patient. *Case Rep Oncol* 9, 112–118.

Altieri DC. (2003) Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene.* Nov 24;22(53):8581-9.

Anders, L., Ke, N., Hydbring, P., Choi, Y.J., Widlund, H.R., Chick, J.M., Zhai, H., Vidal, M., Gygi, S.P., Braun, P., et al. (2011). A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer Cell* 20, 620–634.

Anderson, H., & Roberge, M. (1996). *Cell Growth Differ*, 7, 83–90.

Arora, J., Sauer, S.J., Tarpley, M., Vermeulen, P., Rypens, C., Van Laere, S., Williams, K.P., Devi, G.R., and Dewhirst, M.W. (2017). Inflammatory breast cancer tumor emboli express high levels of anti-apoptotic proteins: use of a quantitative high content and high-throughput 3D IBC spheroid assay to identify targeting strategies. *Oncotarget* 8, 25848–25863.

Bai, L., Smith, D.C., and Wang, S. (2014). Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics. *Pharmacol. Ther.* 144, 82–95.

Balko, J.M., Giltane, J.M., Wang, K., Schwarz, L.J., Young, C.D., Cook, R.S., Owens, P., Sanders, M.E., Kuba, M.G., Sánchez, V., et al. (2014). Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov* 4, 232–245.

Balli D., V. Ustiyani, Y. Zhang, I.C. Wang, A.J. Masino, X. Ren, J.A. Whitsett, V.V. Kalinichenko, T.V. Kalin. (2013) Foxm1 transcription factor is required for lung fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition, *EMBO J.* 32, 231–244.

Balmano, K., and Cook, S.J. (1999). Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene* 18, 3085–3097.

Bashari, M.H., Fan, F., Vallet, S., Sattler, M., Arn, M., Luckner-Minden, C., Schulze-Bergkamen, H., Zörnig, I., Marme, F., Schneeweiss, A., et al. (2016). Mcl-1 confers protection of Her2-positive breast cancer cells to hypoxia: therapeutic implications. *Breast Cancer Res.* 18, 26.

Bayet-Robert, M., Morvan, D., Chollet, P., and Barthomeuf, C. (2010). Pharmacometabolomics of docetaxel-treated human MCF7 breast cancer cells provides evidence of varying cellular responses at high and low doses. *Breast Cancer Res. Treat.* 120, 613–626.

Belmar, J., and Fesik, S.W. (2015). Small molecule Mcl-1 inhibitors for the treatment of cancer. *Pharmacol. Ther.* 145, 76–84.

Bergamaschi, A., Madak-Erdogan, Z., Kim, Y.J., Choi, Y.-L., Lu, H., and Katzenellenbogen, B.S. (2014). The forkhead transcription factor FOXM1 promotes endocrine resistance and invasiveness in estrogen receptor-positive breast cancer by expansion of stem-like cancer cells. *Breast Cancer Res.* 16, 436.

Bertrand, M.J.M., Milutinovic, S., Dickson, K.M., Ho, W.C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J.W., Jaquith, J.B., Morris, S.J., and Barker, P.A. (2008). clAP1 and clAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol. Cell* 30, 689–700.

Bettaieb, A., Paul, C., Plenchette, S., Shan, J., Chouchane, L., and Ghiringhelli, F. (2017). Precision medicine in breast cancer: reality or utopia? *Journal of Translational Medicine* 15.

Borner, C. (1996). Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 271, 12695–12698.

Boulaire, J., Fotedar, A., and Fotedar, R. (2000). The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol. Biol.* 48, 190–202.

Bouvard, V., Zaitchouk, T., Vacher, M., Duthu, A., Canivet, M., Choisy-Rossi, C., Nieruchalski, M., and May, E. (2000). Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene* 19, 649–660.

Buarque, C.D., Militão, G.C.G., Lima, D.J.B., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, C., de Moraes, M.O., Cunha-Junior, E.F., Torres-Santos, E.C., Netto, C.D., and Costa, P.R.R. (2011). Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 6885–6891.

Buarque, C.D., Salustiano, E.J., Fraga, K.C., Alves, B.R.M., and Costa, P.R.R. (2014). 11a-N-Tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223), a promising prototype for targeting MDR leukemia cell lines. *Eur J Med Chem* 78, 190–197.

Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, et al. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 282(5393):1497–501

Burnell, M., Levine, M.N., Chapman, J.-A.W., Bramwell, V., Gelmon, K., Walley, B., Vandenberg, T., Chalchal, H., Albain, K.S., Perez, E.A., et al. (2010). Cyclophosphamide, epirubicin, and Fluorouracil versus dose-dense epirubicin and cyclophosphamide followed by Paclitaxel versus Doxorubicin and cyclophosphamide followed by Paclitaxel in node-positive or high-risk node-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 77–82.

Carey, J.B.W., Keyomarsi K. (2017). Targeting the cell cycle in breast cancer. *Breast Diseases: A Year Book, Quarterly* 27, 4.

Campbell KJ, Dhayade S, Ferrari N, Sims AH, Johnson E, Mason SM, Dickson A, Ryan KM, Kalna G, Edwards J, Tait SWG, Blyth K. (2018) MCL-1 is a prognostic indicator and drug target in breast cancer. *Cell Death Dis.* Jan 16;9(2):19.

Cartier, J., Berthelet, J., Marivin, A., Gemble, S., Edmond, V., Plenchette, S., Lagrange, B., Hammann, A., Dupoux, A., Delva, L., et al. (2011). Cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP1) can regulate E2F1 transcription factor-mediated control of cyclin transcription. *J. Biol. Chem.* 286, 26406–26417.

Cavaco, M.C., Pereira, C., Kreutzer, B., Gouveia, L.F., Silva-Lima, B., Brito, A.M., and Videira, M. (2017). Evading P-glycoprotein mediated-efflux chemoresistance using Solid Lipid Nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 110, 76–84.

Cejalvo, J.M., Martínez de Dueñas, E., Galván, P., García-Recio, S., Burgués Gasión, O., Paré, L., Antolín, S., Martinello, R., Blancas, I., Adamo, B., et al. (2017). Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res.* 77, 2213–2221.

Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855–862.

Chang, D.W., Xing, Z., Capacio, V.L., Peter, M.E., and Yang, X. (2003). Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J.* 22, 4132–4142.

Chen, J.-J., Liu, S.-P., Zhao, J., Wang, S.-C., Liu, T.-J., and Li, X. (2017). Effects of

a novel photoactivated photosensitizer on MDR1 over-expressing human breast cancer cells. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 171, 67–74.

Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., Hu, T., Jiang, L., and Li, J. (2016). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.* 370, 153–164.

Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S.J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* 8, 705–711.

Cheng, X., Shi, W., Zhao, C., Zhang, D., Liang, P., Wang, G., and Lu, L. (2016). Triptolide sensitizes human breast cancer cells to tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by inhibiting activation of the nuclear factor- κ B pathway. *Mol Med Rep* 13, 3257–3264.

Cherdyntseva, N.V., Litviakov, N.V., Denisov, E.V., Gervas, P.A., and Cherdyntsev, E.S. (2017). Circulating tumor cells in breast cancer: functional heterogeneity, pathogenetic and clinical aspects. *Exp. Oncol.* 39, 2–11.

Chiong, M., Wang, Z.V., Pedrozo, Z., Cao, D.J., Troncoso, R., Ibacache, M., Criollo, A., Nemchenko, A., Hill, J.A., and Lavandero, S. (2011). Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis* 2, e244.

Choi, Y., Lee, H.J., Jang, M.H., Gwak, J.M., Lee, K.S., Kim, E.J., Kim, H.J., Lee, H.E., and Park, S.Y. (2013). Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer. *Hum. Pathol.* 44, 2581–2589.

Chou, T.-C. (2010). Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research* 70, 440–446.

Chou, T.C., and Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 27–55.

Chrisanther, R., Knappskog, S., Løkkevik, E., Anker, G., Ostenstad, B., Lundgren, S., Risberg, T., Mjaaland, I., Skjønberg, G., Aas, T., et al. (2011). Predictive and prognostic impact of TP53 mutations and MDM2 promoter genotype in primary breast cancer patients treated with epirubicin or paclitaxel. *PLoS ONE* 6, e19249.

Christofori, G., and Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24, 73–76.

Ciriello, G., Gatzka, M.L., Beck, A.H., Wilkerson, M.D., Rhie, S.K., Pastore, A., Zhang, H., McLellan, M., Yau, C., Kandoth, C., et al. (2015). Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell* 163, 506–519.

Coates, A.S., Winer, E.P., Goldhirsch, A., Gelber, R.D., Gnant, M., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., Senn, H.-J., and Panel Members (2015). Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann. Oncol.* 26, 1533–1546.

Cornejo-Moreno, B.A., Uribe-Escamilla, D., and Salamanca-Gómez, F. (2014). Breast cancer genes: looking for BRACA's lost brother. *Isr. Med. Assoc. J.* 16, 787–792.

Cortopassi, W.A., Penna-Coutinho, J., Aguiar, A.C.C., Pimentel, A.S., Buarque, C.D., Costa, P.R.R., Alves, B.R.M., França, T.C.C., and Krettli, A.U. (2014). Theoretical and experimental studies of new modified isoflavonoids as potential inhibitors of topoisomerase I from *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE* 9, e91191.

Cory, S., Huang, D.C.S., and Adams, J.M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590–8607.

Coutant, C., Rouzier, R., Qi, Y., Lehmann-Che, J., Bianchini, G., Iwamoto, T., Hortobagyi, G.N., Symmans, W.F., Uzan, S., Andre, F., et al. (2011). Distinct p53 gene signatures are needed to predict prognosis and response to chemotherapy in ER-positive and ER-negative breast cancers. *Clin. Cancer Res* 17, 2591–2601.

Crook, N.E., Clem, R.J., Miller, L.K. (1993) An apoptosis inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 67, 2168–2174.

Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.-F., Turashvili, G., Rueda, O.M., Dunning, M.J., Speed, D., Lynch, A.G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., et al. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486, 346–352.

Dai, X., Xiang, L., Li, T., and Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer* 7, 1281–1294.

Dartier, J., Lemaitre, E., Chourpa, I., Goupille, C., Servais, S., Chevalier, S., Mahéo, K., and Dumas, J.-F. (2017). ATP-dependent activity and mitochondrial localization of drug efflux pumps in doxorubicin-resistant breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 1075–1084.

Delbridge, A.R.D., Grabow, S., Strasser, A., and Vaux, D.L. (2016). Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 16, 99–109.

Ding, Q., He, X., Xia, W., Hsu, J.-M., Chen, C.-T., Li, L.-Y., Lee, D.-F., Yang, J.-Y., Xie, X., Liu, J.-C., et al. (2007). Myeloid cell leukemia-1 inversely correlates with glycogen synthase kinase-3 β activity and associates with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res.* 67, 4564–4571.

Doisneau-Sixou, S.F., Sergio, C.M., Carroll, J.S., Hui, R., Musgrove, E.A., and Sutherland, R.L. (2003). Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* 10, 179–186.

Doublier S, Belisario DC, Polimeni M, Annaratone L, Riganti C, Allia E, Ghigo D, Bosia A, Sapino A. (2012) HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemoresistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *BMC cancer.* 12:4.

Dresemann, G. (2010). Temozolomide in malignant glioma. *Onco Targets Ther* 3, 139–146.

Dunnwald, L.K., Rossing, M.A., and Li, C.I. (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 9, R6.

Eckelman, B.P., Salvesen, G.S., and Scott, F.L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep.* 7, 988–994.

Elmore, S. (2007) Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35:495–516.

Elmore, L.W., Rehder, C.W., Di, X., McChesney, P.A., Jackson-Cook, C.K., Gewirtz, D.A., and Holt, S.E. (2002). Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J. Biol. Chem.* 277, 35509–35515.

Elliott, N.T.; Yuan, F.A. (2011) Review of Three-Dimensional In Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.100, n.1 ,p.59.74.

Fischel, J.-L., Formento, P., and Milano, G. (2005). Epidermal growth factor receptor double targeting by a tyrosine kinase inhibitor (Iressa) and a monoclonal antibody (Cetuximab). Impact on cell growth and molecular factors. *Br. J. Cancer* 92, 1063–1068.

Flatt, P.M., Tang, L.J., Scatena, C.D., Szak, S.T., and Pietenpol, J.A. (2000). p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4210–4223.

Friedrich, J., Eder, W., Castaneda, J., Doss, M., Huber, E., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L.A. (2007). A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *J Biomol Screen* 12, 925–937.

Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L.A. (2009). Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* 4, 309–324.

Froehlich, K., Haeger, J.-D., Heger, J., Pastuschek, J., Photini, S.M., Yan, Y., Lupp, A., Pfarrer, C., Mrowka, R., Schleußner, E., et al. (2016). Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 21, 89–98.

Fujise, K., Zhang, D., Liu, J., and Yeh, E.T. (2000). Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 275, 39458–39465.

Fulda, S., and Vucic, D. (2012). Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 11, 109–124.

Gao, Y., Shen, J.K., Choy, E., Zhang, Z., Mankin, H.J., Hornicek, F.J., and Duan, Z. (2016). Pharmacokinetics and tolerability of NSC23925b, a novel P-glycoprotein inhibitor: preclinical study in mice and rats. *Sci Rep* 6, 25659.

Gasca, J., Flores, M.L., Giráldez, S., Ruiz-Borrego, M., Tortolero, M., Romero, F., Japón, M.A., and Sáez, C. (2016). Loss of FBXW7 and accumulation of MCL1 and

PLK1 promote paclitaxel resistance in breast cancer. *Oncotarget* 7, 52751–52765.

Gearing, A.J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A.H., Drummond, A.H., Galloway, W.A., Gilbert, R., and Gordon, J.L. (1994). Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature* 370, 555–557.

Gewies, A. Introduction to Apoptosis. Disponível em <<http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev>> Acessado em 15 de Julho 2017.

Gewirtz, D.A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* 57, 727–741.

Goldstein, L.J., Galski, H., Fojo, A., Willingham, M., Lai, S.L., Gazdar, A., Pirker, R., Green, A., Crist, W., and Brodeur, G.M. (1989). Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 116–124.

Gottesman, M.M., Fojo, T., and Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2, 48–58.

Gradishar, W.J., Anderson, B.O., Balassanian, R., Blair, S.L., Burstein, H.J., Cyr, A., Elias, A.D., Farrar, W.B., Forero, A., Giordano, S.H., et al. (2015). NCCN Guidelines Insights Breast Cancer, Version 1.2016. *J Natl Compr Canc Netw* 13, 1475–1485.

Gross, A., and Katz, S.G. (2017). Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell Death Differ.* 24, 1348–1358.

Gyrd-Hansen, M., and Meier, P. (2010). IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 561–574.

Han, D., Wu, G., Chang, C., Zhu, F., Xiao, Y., Li, Q., Zhang, T., and Zhang, L. (2015). Disulfiram inhibits TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and stem-like features in breast cancer via ERK/NF- κ B/Snail pathway. *Oncotarget* 6, 40907–40919.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805–816.

Hasegawa, S., Miyoshi, Y., Egawa, C., Ishitobi, M., Taguchi, T., Tamaki, Y., Monden, M., and Noguchi, S. (2003). Prediction of response to docetaxel by quantitative analysis of class I and III beta-tubulin isotype mRNA expression in human breast cancers. *Clin. Cancer Res.* 9, 2992–2997.

Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., and Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int* 2014, 150845.

Hatok, J., and Racay, P. (2016). Bcl-2 family proteins: master regulators of cell survival. *Biomol Concepts* 7, 259–270.

He, C., Li, L., Guan, X., Xiong, L., and Miao, X. (2017). Mutant p53 Gain of Function and Chemoresistance: The Role of Mutant p53 in Response to Clinical Chemotherapy. *Chemotherapy* 62, 43–53.

Hermawan, A., Wagner, E., and Roidl, A. (2016). Consecutive salinomycin treatment reduces doxorubicin resistance of breast tumor cells by diminishing drug efflux pump expression and activity. *Oncol. Rep.* 35, 1732–1740.

Hernández-Vargas, H., Palacios, J., and Moreno-Bueno, G. (2007). Molecular profiling of docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: uncoupling of aberrant mitosis and apoptosis. *Oncogene* 26, 2902–2913.

Hollestelle A, Nagel JH, Smid M, Lam S, Elstrodt F, Wasielewski M, Ng SS, French PJ, Peeters JK, Rozendaal MJ, Riaz M, Koopman DG, Ten Hagen TL, de Leeuw BH, Zwarthoff EC, Teunisse A, van der Spek PJ, Klijn JG, Dinjens WN, Ethier SP, Clevers H, Jochemsen AG, den Bakker MA, Foekens JA, Martens JW, Schutte M. (2010) Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* May;121(1):53-64.

Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., and Johnston, P.G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer* 13, 714–726.

Horn, H.F., and Vousden, K.H. (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 26, 1306–1316.

Huang, L., Li, A., Liao, G., Yang, F., Yang, J., Chen, X., and Jiang, X. (2017). Curcumol triggers apoptosis of p53 mutant triple-negative human breast cancer MDA-MB 231 cells via activation of p73 and PUMA. *Oncol Lett* 14, 1080–1088.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Disponível em <<http://www2.inca.gov.br>> Acessado em 05 de Outubro 2018.

Inwald, E.C., Klinkhammer-Schalke, M., Hofstädter, F., Zeman, F., Koller, M., Gerstenhauer, M., and Ortmann, O. (2013). Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res. Treat.* 139, 539–552.

Ivanov, D.P., & Grabowska, A.M. (2017) Spheroid array for high-throughput single-cell analysis of spatial patterns and biomarker expression in 3D. *Scientific Reports.* Nature. 7, 41160.

Janumyan, Y.M., Sansam, C.G., Chattopadhyay, A., Cheng, N., Soucie, E.L., Penn, L.Z., Andrews, D., Knudson, C.M., and Yang, E. (2003). Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *EMBO J.* 22, 5459–5470.

Johnson, M.E., and Howerth, E.W. (2004). Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet. Pathol.* 41, 599–607.

Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 13, 455–

465.

Juríková, M., Danihel, L., Polák, Š., and Varga, I. (2016). Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem.* 118, 544–552.

Kadam, C.Y., and Abhang, S.A. (2016). Apoptosis Markers in Breast Cancer Therapy. *Adv Clin Chem* 74, 143–193.

Kang, S., Kim, E.-O., Kim, S.-H., Lee, J.-H., Ahn, K.S., Yun, M., and Lee, S.-G. (2017). Morusin induces apoptosis by regulating expression of Bax and Survivin in human breast cancer cells. *Oncol Lett* 13, 4558–4562.

Katayose, D., Gudas, J., Nguyen, H., Srivastava, S., Cowan, K.H., and Seth, P. (1995). Cytotoxic effects of adenovirus-mediated wild-type p53 protein expression in normal and tumor mammary epithelial cells. *Clin. Cancer Res.* 1, 889–897.

Kaushik V, Yakisich JS, Way LF, Azad N and Iyer AKV. (2018) Chemoresistance of cancer floating cells is independent of their ability to form 3D structures: Implications for anticancer drug screening. *J Cell Physiol.* 1–9.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.

Kill, I.R. (1996). Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J. Cell. Sci.* 109 (Pt 6), 1253–1263.

Kim, B., Fatayer, H., Hanby, A.M., Horgan, K., Perry, S.L., Valleley, E.M.A., Verghese, E.T., Williams, B.J., Thorne, J.L., and Hughes, T.A. (2013). Neoadjuvant chemotherapy induces expression levels of breast cancer resistance protein that predict disease-free survival in breast cancer. *PLoS ONE* 8, e62766.

Kim, J.B.; Stein, R.; O'hare, M.J. (2004) Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer – a review. *Brest Cancer Research and Treatment.* v.85, n.3, p.281–291.

Kitagawa, M., and Lee, S.H. (2015). The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis. *Front Cell Dev Biol* 3, 14.

Klein, U.R., Nigg, E.A., and Gruneberg, U. (2006). Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP. *Mol. Biol. Cell* 17, 2547–2558.

Kluck, R.M., Bossy-Wetzler, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132–1136.

Konopleva M, Pollyea DA, Potluri J, Chyla B, Hogdal L, Busman T, McKeegan E, Salem AH, Zhu M, Ricker JL, Blum W, DiNardo CD, Kadia T, Dunbar M, Kirby R, Falotico N, Levenson J, Humerickhouse R, Mabry M, Stone R, Kantarjian H, Letai A.(2016)Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of

Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov.* Oct;6(10):1106-1117.

Koshkin, V., Ailles, L.E., Liu, G., and Krylov, S.N. (2017). Preservation of the 3D Phenotype Upon Dispersal of Cultured Cell Spheroids Into Monolayer Cultures. *J. Cell. Biochem.* 118, 154–162.

Kuzmicic, J., Del Campo, A., López-Crisosto, C., Morales, P.E., Pennanen, C., Bravo-Sagua, R., Hechenleitner, J., Zepeda, R., Castro, P.F., Verdejo, H.E., et al. (2011). [Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure]. *Rev Esp Cardiol* 64, 916–923.

Kwa, M., Makris, A., and Esteva, F.J. (2017). Clinical utility of gene-expression signatures in early stage breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.*

Jin, G., Lan, Y., Han, F., Sun, Y., Liu, Z., Zhang, M., Liu, X., Zhang, X., Hu, J., Liu, H., Wang, B. (2016). Smac mimetic-induced caspase-independent necroptosis requires RIP1 in breast cancer. *Mol Med Rep* 13, 359–66.

Langerød, A., Zhao, H., Borgan, Ø., Nesland, J.M., Bukholm, I.R.K., Ikdahl, T., Kåresen, R., Børresen-Dale, A.-L., and Jeffrey, S.S. (2007). TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 9, R30.

Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC.(1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature.* Dec 10;396(6711):580-4.

Li, F., Ackermann, E.J., Bennett, C.F., Rothermel, A.L., Plescia, J., Tognin, S., Villa, A., Marchisio, P.C., and Altieri, D.C. (1999). Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat. Cell Biol.* 1, 461–466.

Li, S., Wang, L., Meng, Y., Chang, Y., Xu, J., and Zhang, Q. (2017). Increased levels of LAPTM4B, VEGF and survivin are correlated with tumor progression and poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget* 8, 41282–41293.

Li, T., Danelisen, I., and Singal, P.K. (2002). Early changes in myocardial antioxidant enzymes in rats treated with adriamycin. *Mol. Cell. Biochem.* 232, 19–26.

Lin RZ, Chang HY. *Biotechnol J.* (2008) Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. Oct; 3(9-10):1172-84.

Liotta, L. A., Mandler, R., Murano, G., Katz, D. A., Gordon, R. K., Chiang, P. K., and Schiffman, E. (1986) Tumor cell autocrine factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 3302–3306.

Liu, T., Zhang, X., Shang, M., Zhang, Y., Xia, B., Niu, M., Liu, Y., and Pang, D. (2013). Dysregulated expression of Slug, vimentin, and E-cadherin correlates with poor clinical outcome in patients with basal-like breast cancer. *J Surg Oncol* 107, 188–194.

Lombaerts, M., van Wezel, T., Philippo, K., Dierssen, J.W.F., Zimmerman, R.M.E., Oosting, J., van Eijk, R., Eilers P.H., van de Water B., Cornelisse C.J., and Cleton-

Jansen, A.M. (2006). E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer* 94, 661–671.

Longley, D.B., and Johnston, P.G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* 205, 275–292.

Lønning, P.E., and Knappskog, S. (2013). Mapping genetic alterations causing chemoresistance in cancer: identifying the roads by tracking the drivers. *Oncogene* 32, 5315–5330.

Lukacs, C., Belunis, C., Crowther, R., Danho, W., Gao, L., Goggin, B., Janson, C.A., Li, S., Remiszewski, S., Schutt, A., et al. (2013). The structure of XIAP BIR2: understanding the selectivity of the BIR domains. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 69, 1717–1725.

Mahotka, C., Liebmann, J., Wenzel, M., Suschek, C.V., Schmitt, M., Gabbert, H.E., and Gerharz, C.D. (2002). Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ.* 9, 1334–1342.

Maia, R.C., Vasconcelos, F.C., de Sá Bacelar, T., Salustiano, E.J., da Silva, L.F.R., Pereira, D.L., Moellman-Coelho, A., Netto, C.D., da Silva, A.J., Rumjanek, V.M., et al. (2011). LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. *Invest New Drugs* 29, 1143–1155.

Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 15, 122.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-166.

Marshall, C. (1999). How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 732–736.

Marusawa, H., Matsuzawa, S.-I., Welsh, K., Zou, H., Armstrong, R., Tamm, I., and Reed, J.C. (2003). HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J.* 22, 2729–2740.

Mason KD, Khaw SL, Rayeroux KC, Chew E, Lee EF, Fairlie WD, Grigg AP, Seymour JF, Szer J, Huang DC, Roberts AW. (2009) The BH3 mimetic compound, ABT-737, synergizes with a range of cytotoxic chemotherapy agents in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. Nov;23(11):2034-41.

Maximchik, P.V., Kulikov, A.V., Zhivotovsky, B.D., and Gogvadze, V.G. (2016). Cellular Energetics as a Target for Tumor Cell Elimination. *Biochemistry Mosc.* 81, 65–79.

Mazzoleni, G., Di Lorenzo, D., and Steimberg, N. (2009). Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr* 4, 13–22.

Mendes JA, Salustiano EJ, Pires CS, Oliveira T, Barcellos JCF, Cifuentes JMC, Costa PRR, Rennó MN, Buarque CD. 11a-N-tosyl-5-carbapterocarpanes: Synthesis, antineoplastic evaluation and in silico prediction of ADMETox properties. *Bioorg Chem.* 2018 Oct;80:585-590.

Menezes MC, Guimarães, I, Ferreira LB, Rangel L, Maia RC, Nestal de Moraes G, Gimba E. Osteopontin-c mediates drug resistance in breast and ovarian carcinoma cells. Manuscrito em preparo.

Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*, 164, 192–204.

Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190.

Mickley, L.A., Lee, J.S., Weng, Z., Zhan, Z., Alvarez, M., Wilson, W., Bates, S.E., and Fojo, T. (1998). Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors. *Blood* 91, 1749–1756.

Millour, J., de Olano, N., Horimoto, Y., Monteiro, L.J., Langer, J.K., Aligue, R., Hajji, N., Lam, E.W. (2011). Atm and p53 regulate foxm1 expression via e2f in breast cancer epirubicin treatment and resistance. *Mol Cancer Ther* 10, 1046-1058.

Mita, A.C., Mita, M.M., Nawrocki, S.T., and Giles, F.J. (2008). Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res.* 14, 5000–5005.

Mitri, Z., Constantine, T., and O'Regan, R. (2012). The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract* 2012, 743193.

Moreno-Aspitia, A., and Perez, E.A. (2009). Anthracycline- and/or taxane-resistant breast cancer: results of a literature review to determine the clinical challenges and current treatment trends. *Clin Ther* 31, 1619–1640.

Morinaga S, Nakamura Y, Ishiwa N, Yoshikawa T, Noguchi Y, Yamamoto Y, Rino Y, Imada T, Takanashi Y, Akaike M, Sugimasa Y, Takemiya S (2004) Expression of surviving mRNA associates with apoptosis, proliferation and histologically aggressive features in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 6:1189–1194

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

Muftah, A.A., Aleskandarany, M.A., Al-Kaabi, M.M., Sonbul, S.N., Diez-Rodriguez, M., Nolan, C.C., Caldas, C., Ellis, I.O., Rakha, E.A., and Green, A.R. (2017). Ki67 expression in invasive breast cancer: the use of tissue microarrays compared with whole tissue sections. *Breast Cancer Res. Treat.* 164, 341–348.

Murray, S., Briasoulis, E., Linardou, H., Bafaloukos, D., and Papadimitriou, C. (2012). Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat. Rev.* 38, 890–903.

Murtagh, G., Lyons, T., O'Connell, E., Ballot, J., Geraghty, L., Fennelly, D., Gullo, G., Ledwidge, M., Crown, J., Gallagher, J., et al. (2016). Late cardiac effects of chemotherapy in breast cancer survivors treated with adjuvant doxorubicin: 10-year follow-up. *Breast Cancer Res. Treat.* 156, 501–506.

Nagaraja, G.M., Othman, M., Fox, B.P., Alsaber, R., Pellegrino, C.M., Zeng, Y., Khanna, R., Tamburini, P., Swaroop, A., and Kandpal, R.P. (2006). *Gene*

expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics. *Oncogene* 25, 2328–2338.

Nestal de Moraes, G., Castro, C.P., Salustiano, E.J., Dumas, M.L., Costas, F., Lam, E.W.-F., Costa, P.R.R., and Maia, R.C. (2014). The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells of distinct molecular subtypes and targets FoxO3a and FoxM1 transcription factors. *Int. J. Oncol.* 45, 1949–1958.

Nestal de Moraes, G., Delbue, D., Silva, K.L., Robaina, M.C., Khongkow, P., Gomes, A.R., Zona, S., Crocamo, S., Mencialha, A.L., Magalhães, L.M., et al. (2015). FOXM1 targets XIAP and Survivin to modulate breast cancer survival and chemoresistance. *Cell. Signal.* 27, 2496–2505.

Netto, C.D., da Silva, A.J.M., Salustiano, E.J.S., Bacelar, T.S., Riça, I.G., Cavalcante, M.C.M., Rumjanek, V.M., and Costa, P.R.R. (2010). New pterocarpanquinones: synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF-alpha modulation in human PBMC cells. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 1610–1616.

Nieto, M.A. (2013). Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* 342, 1234850.

Ning Y, Shen Q, Herrick K et al (2012) Abstract LB-339: cause of death in cancer survivors. *Cancer Res* 72:LB-339.

Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199–203.

O'Brien, M.E., Leonard, R.C., Barrett-Lee, P.J., Eggleton, S.P., and Bizzari, J.P. (1999). Docetaxel in the community setting: an analysis of 377 breast cancer patients treated with docetaxel (Taxotere) in the UK. UK Study Group. *Ann. Oncol.* 10, 205–210.

Obexer, P., and Ausserlechner, M.J. (2014). X-linked inhibitor of apoptosis protein – a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy. *Front. in Oncol.* 4, 197.

Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., et al. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435, 677–681.

Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., and Weinberg, R.A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 68, 3645–3654.

Ow, Y.-L.P., Green, D.R., Hao, Z., and Mak, T.W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 532–542.

Panayotopoulou, E.G., Müller, A.-K., Börries, M., Busch, H., Hu, G., and Lev, S. (2017). Targeting of apoptotic pathways by SMAC or BH3 mimetics distinctly sensitizes paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells. *Oncotarget* 8,

45088–45104.

Panis, C., Lemos, L.G.T., Victorino, V.J., Herrera, A.C.S.A., Campos, F.C., Colado Simão, A.N., Pinge-Filho, P., Cecchini, A.L., and Cecchini, R. (2012). Immunological effects of Taxol and Adryamicin in breast cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 61, 481–488.

Park, Y.-Y., Jung, S.Y., Jennings, N.B., Rodriguez-Aguayo, C., Peng, G., Lee, S.-R., Kim, S.B., Kim, K., Leem, S.-H., Lin, S.-Y., et al. (2012). FOXM1 mediates Dox resistance in breast cancer by enhancing DNA repair. *Carcinogenesis* 33, 1843–1853.

Parrish, A.B., Freel, C.D., and Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.

Penault-Llorca, F., and Radošević-Robin, N. (2017). Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology* 49, 166–171.

Perciavalle, R.M., and Opferman, J.T. (2013). Delving deeper: MCL-1's contributions to normal and cancer biology. *Trends Cell Biol.* 23, 22–29.

Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752.

Pluta, P., Jeziorski, A., Cebula-Obrzut, A.P.B., Wierzbowska, A., Piekarski, J., and Smolewski, P. (2015). Expression of IAP family proteins and its clinical importance in breast cancer patients. *Neoplasma* 62, 666–673.

Polyak, K., and Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* 9, 265–273.

Prives, C. (1993). Doing the right thing: feedback control and p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 214–218.

Punnoose EA, Levenson JD, Peale F, Boghaert ER, Belmont LD, Tan N, Young A, Mitten M, Ingalla E, Darbonne WC, Oleksijew A, Tapang P, Yue P, Oeh J, Lee L, Maiga S, Fairbrother WJ, Amiot M, Souers AJ, Sampath D. (2016) Expression Profile of BCL-2, BCL-XL, and MCL-1 Predicts Pharmacological Response to the BCL-2 Selective Antagonist Venetoclax in Multiple Myeloma Models. *Mol Cancer Ther.* May;15(5):1132-44.

Quentmeier H, Drexler HG, Hauer V, MacLeod RAF, Pommerenke C, Uphoff CC, et al. (2016) Diffuse large B cell lymphoma cell line U-2946: model for MCL1 inhibitor testing. *PLoS ONE* 11:e0167599.

Reed, J.C. (2002). Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 1, 111–121.

Reguera, R.M., Redondo, C.M., Gutierrez de Prado, R., Pérez-Pertejo, Y., and Balaña-Fouce, R. (2006). DNA topoisomerase I from parasitic protozoa: a potential target for chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1759, 117–131.

Rieger, A.M., Nelson, K.L., Konowalchuk, J.D., and Barreda, D.R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*.

Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 402–412.

Riordan, J.R., and Ling, V. (1985). Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance. *Pharmacol. Ther.* 28, 51–75.

Ross, J.S., Linette, G.P., Stec, J., Clark, E., Ayers, M., Leschly, N., Symmans, W.F., Hortobagyi, G.N., and Pusztai, L. (2003). Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3, 573–585.

Rudin CM, Hann CL, Garon EB et al (2012) Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 18(11):3163–3169

Saba, R., Alsayed, A., Zacny, J.P., and Dudek, A.Z. (2016). The Role of Forkhead Box Protein M1 in Breast Cancer Progression and Resistance to Therapy. *Int J Breast Cancer* 2016, 9768183.

Salustiano, E.J., Dumas, M.L., Silva-Santos, G.G., Netto, C.D., Costa, P.R.R., and Rumjanek, V.M. (2016). In vitro and in vivo antineoplastic and immunological effects of pterocarpanquinone LQB-118. *Invest New Drugs* 34, 541–551.

dos Santos, M.L., Gimenes, K.P., Silva, W.A., and Nagai, M.A. (2009). Transcriptome changes induced by docetaxel in human mammary cell lines expressing different levels of ERBB2. *Int. J. Mol. Med.* 23, 733–743.

Sarisozen, C., Abouzeid, A.H., and Torchilin, V.P. (2014). The effect of co-delivery of paclitaxel and curcumin by transferrin-targeted PEG-PE-based mixed micelles on resistant ovarian cancer in 3-D spheroids and in vivo tumors. *Eur J Pharm Biopharm* 88, 539–550.

Sarrió, D., Rodríguez-Pinilla, S.M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., and Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 68, 989–997.

Sawyer, D.B. (2013). Anthracyclines and heart failure. *N. Engl. J. Med.* 368, 1154–1156.

Saxena, M., Stephens, M.A., Pathak, H., and Rangarajan, A. (2011). Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis* 2, e179.

Schile, A.J., García-Fernández, M., and Steller, H. (2008). Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes Dev.* 22, 2256–2266.

Schneider-Brachert, W., Heigl, U., and Ehrenschwender, M. (2013). Membrane trafficking of death receptors: implications on signalling. *Int J Mol Sci* 14, 14475–14503.

Scott, F.L., Denault, J.-B., Riedl, S.J., Shin, H., Renatus, M., and Salvesen, G.S.

(2005). XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J.* 24, 645–655.

Shalli, K., Brown, I., Heys, S.D., and Schofield, A.C. (2005). Alterations of beta-tubulin isotypes in breast cancer cells resistant to docetaxel. *FASEB J.* 19, 1299–1301.

Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., and Andrews, D.W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 508–520.

Shi, Z., Liang, Y.-J., Chen, Z.-S., Wang, X.-H., Ding, Y., Chen, L.-M., and Fu, L.-W. (2007). Overexpression of Survivin and XIAP in MDR cancer cells unrelated to P-glycoprotein. *Oncol. Rep.* 17, 969–976.

Silva, M.M., Nascimento, E.O.O., Silva, E.F., Araújo, J.X. de, Santana, C.C., Grillo, L.A.M., de Oliveira, R.S., R R Costa, P., Buarque, C.D., Santos, J.C.C., et al. (2017). Interaction between bioactive compound 11a-N-tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223) and Calf thymus DNA: Spectroscopic approach, electrophoresis and theoretical studies. *Int. J. Biol. Macromol.* 96, 223–233.

Silwal-Pandit, L., Vollan, H.K.M., Chin, S.-F., Rueda, O.M., McKinney, S., Osako, T., Quigley, D.A., Kristensen, V.N., Aparicio, S., Børresen-Dale, A.-L., et al. (2014). TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. *Clin. Cancer Res.* 20, 3569–3580.

Simões-Wüst, A.P., Schürpf, T., Hall, J., Stahel, R.A., and Zangemeister-Wittke, U. (2002). Bcl-2/bcl-xL bispecific antisense treatment sensitizes breast carcinoma cells to doxorubicin, paclitaxel and cyclophosphamide. *Breast Cancer Res. Treat.* 76, 157–166.

Slamon, D., Eiermann, W., Robert, N., Pienkowski, T., Martin, M., Press, M., Mackey, J., Glaspy, J., Chan, A., Pawlicki, M., et al. (2011). Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 365, 1273–1283.

Schito L, Semenza GL. (2016) Hypoxia-inducible factors: master regulators of cancer progression. *Trends Cancer.* 2:758–70.

Sommers, C.L., Heckford, S.E., Skerker, J.M., Worland, P., Torri, J.A., Thompson, E.W., Byers, S.W., and Gelmann, E.P. (1992). Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 52, 5190–5197.

de Souza Reis, F.R., de Faria, F.C.C., Castro, C.P., de Souza, P.S., da Cunha Vasconcelos, F., Bello, R.D., da Silva, A.J., Costa, P.R.R., and Maia, R.C. (2013). The therapeutical potential of a novel pterocarpanquinone LQB-118 to target inhibitor of apoptosis proteins in acute myeloid leukemia cells. *Anticancer Agents Med Chem* 13, 341–351.

Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., et al. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112–116.

Stamps, A.C., Davies, S.C., Burman, J., O'Hare, M.J. (1994). Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive sv40 t-antigen construct. *Int J Cancer* 57, 865-874.

Stěrba, M., Popelová, O., Vávrová, A., Jirkovský, E., Kovaříková, P., Geršl, V., and Simůnek, T. (2013). Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 899–929.

Sunters, A., Fernández de Mattos, S., Stahl, M., Brosens, J.J., Zoumpoulidou, G., Saunders, C.A., Coffey, P.J., Medema, R.H., Coombes, R.C., and Lam, E.W.-F. (2003). FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 278, 49795–49805.

Takebe, N., Warren, R.Q., and Ivy, S.P. (2011). Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res.* 13, 211.

Tamaki, A., Ierano, C., Szakacs, G., Robey, R.W., and Bates, S.E. (2011). The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays Biochem.* 50, 209–232.

Tamanini, E., Buck, I.M., Chessari, G., Chiarparin, E., Day, J.E.H., Frederickson, M., Griffiths-Jones, C.M., Hearn, K., Heightman, T.D., Iqbal, A., et al. (2017). Discovery of a Potent Nonpeptidomimetic, Small-Molecule Antagonist of Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 (cIAP1) and X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP). *J. Med. Chem.* 60, 4611–4625.

Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Motoyoshi, K., Mizuki, M., Tagawa, S., Ohga, S., et al. (1996). Fas ligand in human serum. *Nat. Med.* 2, 317–322.

Tawfik, K., Kimler, B.F., Davis, M.K., Fan, F., and Tawfik, O. (2013). Ki-67 expression in axillary lymph node metastases in breast cancer is prognostically significant. *Hum. Pathol.* 44, 39–46.

Thomadaki, H., and Scorilas, A. (2007). Breast cancer cells response to the antineoplastic agents cisplatin, carboplatin, and doxorubicin at the mRNA expression levels of distinct apoptosis-related genes, including the new member, BCL2L12. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1095, 35–44.

Talmadge, J. E. & Fidler, I. J. (2010) AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 70, 5649–5669.

Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS (2002) Arole for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediatedby VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4349–4354

Trape, A.P., Katayama, M.L., Roela, R.A., Brentani, H., Ravacci, G.R., de Araujo Lima, L., et al. (2012). Gene expression profile in response to doxorubicin-rapamycin combined treatment of her-2-overexpressing human mammary epithelial cell lines. *Mol Cancer Ther* 11, 464-474.

Trock, B.J., Leonessa, F., and Clarke, R. (1997). Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 917–931.

Tsyganov, M.M., Freidin, M.B., Ibragimova, M.K., Deryusheva, I.V., Kazantseva, P.V., Slonimskaya, E.M., Cherdyntseva, N.V., and Litviakov, N.V. (2017). Genetic variability in the regulation of the expression cluster of MDR genes in patients with breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*

Uren, A.G., and Vaux, D.L. (1996). Molecular and clinical aspects of apoptosis. *Pharmacol. Ther.* 72, 37–50.

Vaillant, F., Merino, D., Lee, L., Breslin, K., Pal, B., Ritchie, M.E., Smyth, G.K., Christie, M., Phillipson, L.J., Burns, C.J., et al. (2013). Targeting BCL-2 with the BH3 mimetic ABT-199 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Cell* 24, 120–129.

Vayssade, M., Haddada, H., Faridoni-Laurens, L., Tourpin, S., Valent, A., Bénard, J., and Ahomadegbe, J.-C. (2005). P73 functionally replaces p53 in Adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 116, 860–869.

Vaux, D.L., and Silke, J. (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 287–297.

Végran, F., Boidot, R., Bonnetain, F., Cadouot, M., Chevrier, S., and Lizard-Nacol, S. (2011). Apoptosis gene signature of Survivin and its splice variant expression in breast carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* 18, 783–792.

Vejpongsa, P., and Yeh, E.T.H. (2014). Topoisomerase 2 β : a promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 95, 45–52.

Vela, L., and Marzo, I. (2015). Bcl-2 family of proteins as drug targets for cancer chemotherapy: the long way of BH3 mimetics from bench to bedside. *Curr Opin Pharmacol* 23, 74–81.

Venkitaraman, A.R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108, 171–182.

Vinci, M., Gowan, S., Boxall, F., Patterson, L., Zimmermann, M., Court, W., Lomas, C., Mendiola, M., Hardisson, D., and Eccles, S.A. (2012). Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol.* 10, 29.

Vogel, C., Kienitz, A., Müller, R., and Bastians, H. (2005). The mitotic spindle checkpoint is a critical determinant for topoisomerase-based chemotherapy. *J. Biol. Chem.* 280, 4025–4028.

Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* 2, 594–604.

Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413–431.

- Vtorushin, S.V., Khristenko, K.Y., Zavyalova, M.V., Perelmuter, V.M., Litviakov, N.V., Denisov, E.V., Dulesova, A.Y., and Cherdyntseva, N.V. (2014). The phenomenon of multi-drug resistance in the treatment of malignant tumors. *Exp. Oncol.* 36, 144–156.
- Vuoriluoto K, H. Haugen, S. Kiviluoto, J.P. Mpindi, J. Nevo, C. Gjerdrum, C.Tiron, J.B. Lorens, J. Ivaska, Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer, *Oncogene* 30 (2011) 1436–1448.
- Wang, H., Vo, T., Hajar, A., Li, S., Chen, X., Parissenti, A.M., Brindley, D.N., and Wang, Z. (2014). Multiple mechanisms underlying acquired resistance to taxanes in selected docetaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer* 14, 37.
- Wang, J., Song, Y., Xu, S., Zhang, Q., Li, Y., Tang, D., and Jin, S. (2011). Down-regulation of ICBP90 contributes to doxorubicin resistance. *Eur. J. Pharmacol.* 656, 33–38.
- Wang, S., Bai, L., Lu, J., Liu, L., Yang, C.-Y., and Sun, H. (2012). Targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) for new breast cancer therapeutics. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 17, 217–228.
- Wang, X., Simpson, E.R., and Brown, K.A. (2015). p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. *Cancer Res.* 75, 5001–5007.
- Welch, P.L., Owens, K.N., and King, M.C. (2000). Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet.* 16, 69–74.
- Wells, A., Grahovac, J., Wheeler, S., Ma, B. & Lauffenburger, D. (2013) Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 283–289
- Wertz, I.E., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D.J., Helgason, E., Ernst, J.A., Eby, M., Liu, J., et al. (2011). Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* 471, 110–114.
- Whittaker, S.R., Mallinger, A., Workman, P., and Clarke, P.A. (2017). Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. *Pharmacol. Ther.* 173, 83–105.
- WHO, World Health Organization. Disponível em <<http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie>> Acessado em 15 de Outubro de 2018.
- Williams, M.M., Lee, L., Hicks, D.J., Joly, M.M., Elion, D., Rahman, B., McKernan, C., Sanchez, V., Balko, J.M., Stricker, T., et al. (2017). Key Survival Factor, Mcl-1, Correlates with Sensitivity to Combined Bcl-2/Bcl-xL Blockade. *Mol. Cancer Res.* 15, 259–268.
- Withoff, S., De Jong, S., De Vries, E.G., and Mulder, N.H. (1996). Human DNA topoisomerase II: biochemistry and role in chemotherapy resistance (review). *Anticancer Res.* 16, 1867–1880.
- Wong, R.S.Y. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30, 87.

Wu, Y., Sarkissyan, M., and Vadgama, J.V. (2016). Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *J Clin Med* 5.

Xiao, Y., Nimmer, P., Sheppard, G.S., Bruncko, M., Hessler, P., Lu, X., Roberts-Rapp, L., Pappano, W.N., Elmore, S.W., Souers, A.J., et al. (2015). MCL-1 Is a Key Determinant of Breast Cancer Cell Survival: Validation of MCL-1 Dependency Utilizing a Highly Selective Small Molecule Inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* 14, 1837–1847.

Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701–704.

Yagi T, Takeichi M (2000) Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* 14:1169– 1180

Yang C, Chen H, Tan G, Gao W, Cheng L, Jiang X, Yu L, Tan Y.(2013) FOXM1 promotes the epithelial to mesenchymal transition by stimulating the transcription of Slug in human breast cancer. *Cancer Lett.* Oct 28;340(1):104-12.

Yang, Q., Huang, J., Wu, Q., Cai, Y., Zhu, L., Lu, X., Chen, S., Chen, C., and Wang, Z. (2014a). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition is associated with Skp2 expression in paclitaxel-resistant breast cancer cells. *Br. J. Cancer* 110, 1958–1967.

Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X., and He, K. (2014b). Synergy effects of herb extracts: pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia* 92, 133–147.

Ye, X., Zhang, Y., He, B., Meng, Y., Li, Y., and Gao, Y. (2015). Quantitative proteomic analysis identifies new effectors of FOXM1 involved in breast cancer cell migration. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 15836–15844.

Yeung, K.T., and Yang, J. (2017). Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol* 11, 28–39.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47–59.

Youssef, N.S., Hewedi, I.H., and Abd Raboh, N.M. (2008). Immunohistochemical expression of survivin in breast carcinoma: relationship with clinicopathological parameters, proliferation and molecular classification. *J Egypt Natl Canc Inst* 20, 348–357.

Yu, G., Zhou, A., Xue, J., Huang, C., Zhang, X., Kang, S.-H., Chiu, W.-T., Tan, C., Xie, K., Wang, J., et al. (2015). FoxM1 promotes breast tumorigenesis by activating PDGF-A and forming a positive feedback loop with the PDGF/AKT signaling pathway. *Oncotarget* 6, 11281–11294.

Zafonte, B.T., Hult, J., Amanatullah, D.F., Albanese, C., Wang, C., Rosen, E., Reutens, A., Sparano, J.A., Lisanti, M.P., and Pestell, R.G. (2000). Cell-cycle dysregulation in breast cancer: breast cancer therapies targeting the cell cycle. *Front. Biosci.* 5, D938-961.

Zahreddine, H., and Borden, K.L.B. (2013). Mechanisms and insights into drug

resistance in cancer. *Front Pharmacol* 4, 28.

Zamaraev, A.V., Kopeina, G.S., Prokhorova, E.A., Zhivotovsky, B., and Lavrik, I.N. (2017). Post-translational Modification of Caspases: The Other Side of Apoptosis Regulation. *Trends Cell Biol.* 27, 322–339.

Zhang, Y., Zhu, J., Tang, Y., Li, F., Zhou, H., Peng, B., Zhou, C., and Fu, R. (2011). X-linked inhibitor of apoptosis positive nuclear labeling: a new independent prognostic biomarker of breast invasive ductal carcinoma. *Diagn Pathol* 6, 49.

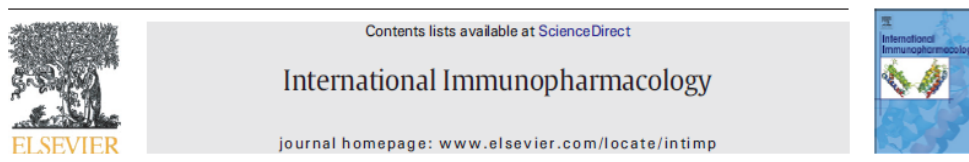
Zeng W, Liu P, Pan W, Singh SR, Wei Y. (2015) Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism. *Cancer Lett.* 356:263–67

Anexos

ANEXO I. Trabalho científico publicado, não relacionado à tese de doutorado

Lemos, L.G.T., Victorino, V.J., Herrera, A.C.S.A., Aranome, A.M.F., Cecchini, A.L., Simão, A.N.C., Panis, C., and Cecchini, R. (2015). Trastuzumab-based chemotherapy modulates systemic redox homeostasis in women with HER2-positive breast cancer. *Int. Immunopharmacol.* 27, 8–14.

International Immunopharmacology 27 (2015) 8–14



Trastuzumab-based chemotherapy modulates systemic redox homeostasis in women with HER2-positive breast cancer



L.G.T. Lemos^a, V.J. Victorino^b, A.C.S.A. Herrera^a, A.M.F. Aranome^e, A.L. Cecchini^e, A.N.C. Simão^c, C. Panis^{d,*}, R. Cecchini^{e,1}

^a Bone Marrow Transplantation Center, National Cancer Institute, INCA, Rio de Janeiro, Brazil
^b Faculty of Medicine, University of São Paulo, USP, São Paulo, Brazil
^c University Hospital, Department of Pharmacy, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil
^d Laboratory of Inflammatory Mediators, State University of West Paraná, UNIOESTE, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil
^e Laboratory of Physiopathology and Free Radicals, Londrina State University, UEL, Londrina, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 January 2015
Received in revised form 7 April 2015
Accepted 17 April 2015
Available online 28 April 2015

Keywords:
Trastuzumab
Inflammatory status
HER2
Oxidative stress
Breast cancer

ABSTRACT

Trastuzumab is an immunotargeting therapeutic against breast tumors with amplification of the human epithelial growth factor receptor 2 (HER2). HER2 patients naturally exhibit disruption in the pro-oxidant inflammatory profiling; however, the impact of trastuzumab-based chemotherapy in modulating this process is still unknown. Here we determined the systemic pro-inflammatory profile of women diagnosed with HER2-amplified tumors, undergoing trastuzumab-based chemotherapy (TZ), and compared the results with that of healthy controls (CTR) and untreated patients with HER2-amplified breast cancer (CA). The plasmatic inflammatory profile was assessed by evaluating pro-oxidant parameters such as lipid peroxidation, total antioxidant capacity (TRAP), levels of advanced oxidation protein products (AOPPs), nitric oxide (NO), C-reactive protein (CRP), and total thiol content. Markers of cardiac damage were also assessed. Our findings showed increased NO levels in TZ than that in either CA or CTR groups. Furthermore, TZ augmented TRAP and reduced total thiol than that of the CA group. Our data also revealed that AOPP levels were significantly higher in the TZ than the CA group. AOPP and the MB fraction of creatine-kinase (CKMB) levels were positively correlated in TZ patients. These findings suggest that trastuzumab-associated chemotherapy can modulate the pro-inflammatory markers of HER2-positive breast cancer patients to the levels found in healthy controls.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Despite significant advances in our understanding of cancer biology, breast cancer remains the most diagnosed neoplasia [1] and one of the leading causes of death among women worldwide [2]. Breast cancer is a heterogeneous disease in which several factors contribute to disease aggressiveness [3]. The amplification/overexpression of human epithelial growth factor receptor 2 (HER2) is an acquired genetic alteration that is well established as an indicator of poor prognosis in breast cancer [4], and it is found in approximately 20–30% of breast tumors [5].

HER2 is a potent oncogene that encodes a transmembrane tyrosine kinase receptor. The oncogenicity of HER2 depends on its dimerization with other HER family members; this interaction allows it to escape normal inhibitory regulation [6]. HER2-containing dimers have long half-lives and exhibit strong and persistent signaling due to both slow ligand

dissociation and internalization [7]. Thus, HER2 excessively stimulates survival and mitogenic pathways [8,9], resulting in overall deregulated signaling [10], reduced apoptosis [11], prolonged cell survival [12], and increased metastatic potential [13].

The sustained signaling induced by HER2 amplification activates several cellular networks, which in turn affects the pro-oxidative inflammatory profiling [14]. The inflammatory process results from several systemic cellular processes, in which the generation of oxidative stress is an important component. Many cancer cells continuously experience oxidative stress due to the presence of significant amounts of reactive oxygen species (ROS) and an impaired antioxidant defense system [15]. Abnormal signaling in HER2-overexpressing cancer cells involving ROS are associated with alterations in PI3K-AKT, NF- κ B, and p53 pathways [16,9,17]; all of these pathways are implicated in oxidative stress modulation. There is a crosstalk between inflammation and oxidative stress responses that depends on its intensity. In addition to its capability to cause DNA instability and cancer, high levels of oxidative stress can further promote disseminated damage to biological components such as lipids and proteins. This consequence can be measured in human plasma by evaluating the profiles of lipid peroxidation, protein oxidation and antioxidants consumption [15,40,43].

* Corresponding author at: Laboratory of Pathophysiology and Free Radicals, Department of General Pathology-Center of Biological Science, State University of Londrina, 86051-990 Londrina, Brazil. Tel: +55 43 3371 4521; fax: +55 43 3371 4267.
E-mail addresses: carolpanis@sercomtel.com.br, carolpanis@hotmail.com (C. Panis).
¹ These authors equally contributed to this study.

ANEXO II Trabalho científico publicado, relacionado à tese de doutorado

Lemos, L.G.T., Nestal de Moraes, G., Delbue, D., Vasconcelos, F. da C., Bernardo, P.S., Lam, E.W.-F., Buarque, C.D., Costa, P.R., and Maia, R.C. (2016). 11a-N-Tosyl-5-deoxi-pterocarpan, LQB-223, a novel compound with potent antineoplastic activity toward breast cancer cells with different phenotypes. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 142, 2119–2130.

J Cancer Res Clin Oncol (2016) 142:2119–2130
DOI 10.1007/s00432-016-2212-6



ORIGINAL ARTICLE – CANCER RESEARCH

11a-N-Tosyl-5-deoxi-pterocarpan, LQB-223, a novel compound with potent antineoplastic activity toward breast cancer cells with different phenotypes

Lauana Greicy Tonon Lemos^{1,2} · Gabriela Nestal de Moraes¹ · Deborah Delbue^{1,2} · Flavia da Cunha Vasconcelos¹ · Paula Sabbo Bernardo^{1,2} · Eric W-F Lam³ · Camilla Djenne Buarque⁴ · Paulo Ribeiro Costa⁵ · Raquel Ciuvalschi Maia¹

Received: 30 April 2016 / Accepted: 26 July 2016 / Published online: 12 August 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Multidrug resistance is the major obstacle for successful treatment of breast cancer, prompting the investigation of novel anticancer compounds.

Purpose In this study, we tested whether LQB-223, an 11a-N-Tosyl-5-deoxi-pterocarpan newly synthesized compound, could be effective toward breast cancer cells.

Methods Human breast cell lines MCF-7, MDA-MB-231, HB4a and MCF-7 Dox^R were used as models for this study. Cell culture, MTT and clonogenic assay, flow cytometry and Western blotting were performed.

Results The LQB-223 decreased cell viability, inhibited colony formation and induced an expressive G2/M arrest in breast cancer cells. There was an induction in p53 and p21^{Cip1} protein levels following treatment of wild-type p53 MCF-7 cells, which was not observed in the mutant p53 MDA-MB-231 cell line, providing evidence that the

compound might act to modulate the cell cycle regardless of p53 status. In addition, LQB-223 resulted in decreased procaspase levels and increased annexin V staining, suggesting that the apoptotic cascade is also triggered. Importantly, LQB-223 treatment was shown to be less cytotoxic to non-neoplastic breast cells than docetaxel and doxorubicin. Strikingly, exposure of doxorubicin-resistant MCF-7-Dox^R cells to LQB-223 resulted in suppression of cell viability and proliferation in levels comparable to MCF-7. Of note, MCF-7-Dox^R cells have an elevated expression of the P-glycoprotein efflux pump when compared to MCF-7. **Conclusion** Together, these results show that LQB-223 mediates cytotoxic effects in sensitive and resistant breast cancer cells, while presenting low toxicity to non-neoplastic cells. The new compound might represent a potential strategy to induce toxicity in breast cancer cells, especially chemoresistant cells.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00432-016-2212-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Raquel Ciuvalschi Maia
rcmaia@inca.gov.br

¹ Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

² Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Oncologia, INCA, Rio de Janeiro, Brazil

³ Department of Surgery and Cancer, Imperial College London, Hammersmith Hospital Campus, London, UK

⁴ Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁵ Laboratório de Química Bioorgânica, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPEN), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Keywords Breast cancer · Drug resistance · LQB-223 compound · Toxicity · Chemotherapeutic agents

Introduction

Human breast tumors are phenotypically heterogeneous and are associated with different clinical outcomes, accounting for high mortality rates in women worldwide (Curtis et al. 2012; Perou et al. 2000). Treatment of breast cancer involves several modalities such as surgery, radio-, chemo-, targeted- and hormonal therapy (Chargari et al. 2009). Doxorubicin (DOX) and docetaxel (DTX) are chemotherapeutic agents commonly used for several types of malignancies, including breast cancer (Burnell et al. 2010). DOX belongs to the anthracyclines class, and some of its antitumor mechanisms of action include DNA

intercalation, DNA damage mediated by reactive oxygen species, inhibition of topoisomerase (topo) II alpha and beta and activation of apoptotic pathways (Lyu et al. 2006; Zhang et al. 2012). However, patients treated with DOX may present some side effects, such as cardiotoxicity (Azim et al. 2011; Bird and Swain 2008; Swain et al. 2003) and acute events such as stomatitis, neutropenia, hematologic toxicity and myelosuppression. In long term, some patients may develop secondary leukemia, necrosis at the injection site, liver injury and hypersensitivity (Panis et al. 2012). DTX belongs to the family of taxanes and has been used as neoadjuvant or adjuvant treatment of breast cancer in association with anthracyclines (Burnell et al. 2010). Its mechanism of action involves stabilization of microtubules by binding with β -tubulin, which leads to an arrest in G2/M phase and induction of cell death (Murray et al. 2012; Shalli et al. 2005). It was reported that taxanes induce systemic changes in the oxidative stress profile of hematopoietic cells of breast cancer patients, resulting in anemia (Panis et al. 2012). Another important aspect related to the use of DOX and DTX relates to the fact that many patients will eventually develop resistance to these drugs, which is the major obstacle to successful treatment (Kumler et al. 2015; Murray et al. 2012). Therefore, the identification of novel compounds that might circumvent mechanisms of drug resistance in breast cancer and exhibit lower toxicity is crucial. Some hybrid compounds between pterocarpan and quinones, named pterocarpanquinones, have been synthesized and had their antineoplastic activity studied in tumor cell models (Buarque et al. 2011). Recently, the LQB-223, an 11a-N-Tosyl-5-deoxi-pterocarpan compound, has been synthesized and shown to induce cytotoxicity in drug-resistant leukemia cells (Buarque et al. 2014).

Here, we investigated the antitumor effects of LQB-223 synthetic compound in human breast cancer cell lines and found that it impairs cell viability, induces apoptotic cell death and modulates signaling pathways involved in cell cycle control. Interestingly, the LQB-223 compound showed also pronounced cell viability and proliferation inhibition in P-glycoprotein (Pgp) overexpressing DOX-resistant cells, suggesting that it can overcome drug resistance in breast cancer. Most importantly, we observed little cytotoxicity toward non-neoplastic breast cells which might point LQB-223 as a promising compound for treatment of breast tumors.

Materials and methods

Drugs

The 11a-N-Tosyl-5-deoxi-pterocarpan, LQB-223, was synthesized in the Laboratório de Química Bioorgânica,

at Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) as described previously (Buarque et al. 2014). The compound was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and used at 1, 2.5, 5, 10, 15 and 20 μ M concentrations. DOX (doxorubicin; Rubidox[®]) and DTX (docetaxel, Docelibs[®]) was provided by Bergamo and Libbs, respectively (São Paulo, Brazil). Dilutions from stock solutions were made prior to use and kept at -20°C . Final concentrations used for most experiments were 1 μ M DOX and 100 nM DTX, since these doses were shown to be clinically relevant (Gewirtz 1999; Hernandez-Vargas et al. 2007).

Cell lines

The human mammary epithelial cell lines MCF-7 (invasive breast ductal carcinoma, wild-type p53, estrogen and progesterone receptors positive, and Her2/neu overexpression negative), MCF-7 Dox^R (DOX-resistant cell line derived from parental MCF-7) (Millour et al. 2011), MDA-MB-231 (invasive breast ductal carcinoma, mutant p53, estrogen, progesterone and Her2 receptors negative) and HB4a (originated from luminal breast cells, negative for estrogen and progesterone receptors and expresses basal levels of HER-2 receptor) (Stamps et al. 1994; Trape et al. 2012) were used as models for this study. The cell lines were cultured in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (Gibco; BRL, UK), supplemented with 10 % heat-inactivated FBS (Gibco) and penicillin/streptomycin (1 μ L/mL) concentration. The HB4a cell line was also cultured with 5 μ M hydrocortisone and insulin. The cell lines were maintained in a humidified atmosphere at 37°C and 5 % CO_2 .

Measurement of cell metabolic viability

After seeding and 24 h adherence, 1×10^4 cells were treated with LQB-223, DOX and DTX for 24, 48 and 72 h and were submitted to the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Mosmann 1983). Absorbance at 492 nm was measured with an ELISA reader (DTX 800 Multimode Detector from Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). The concentrations and experiments were conducted in triplicate. This assay was performed for measurement of drug-mediated changes in cell viability.

Clonogenic assay

A total of 2×10^3 cells were seeded in 6-well plates and then left to adhere overnight and then treated with LQB-223, DOX or DTX. After 24 h, drugs were removed and the cells were maintained in drug-free media for about 14 days, until colony formation. Colonies were fixed in absolute ethanol and stained with 0.05 % crystal violet. The crystals

were diluted in 33 % glacial acetic acid solution, and the optical density was measured at 595 nm.

Cell cycle analysis

A total of 5×10^5 cells were left to adhere onto tissue flasks and exposed to LQB-223, DOX or DTX for 24, 48 and 72 h. Then, cells were harvested by trypsinization, and the DNA content was analyzed following addition of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Propidium Iodide (PI) and ribonuclease A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Fluorescence was measured by flow cytometry using a CyAn ADP (Beckman Coulter Inc; Brea, CA, US).

Cell death assay

The cells were left to adhere, and LQB-223, DTX or DOX were added and maintained for 24, 48 and 72 h. Cells were submitted to trypsinization, washed in 2 % PBS/BSA (phosphate buffered saline with bovine serum albumin) and centrifuged for 3 min at 770 g. Following 30 min of incubation in 2 % PBS/BSA, cells were centrifuged and the pellets were incubated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Annexin V—Alexa Fluor 488 (Life Technologies; Carlsbad, California, EUA), and binding buffer for 15 min, after 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (PI) was added. The annexin V and PI fluorescence were measured by flow cytometry using a CyAn ADP (Beckman Coulter Inc; Brea, CA, US).

Western Blotting

For analysis of p53, p21^{Cip1} and procaspases expression, pellets of 2×10^6 were washed three times in PBS, lysed in Cell Extraction Buffer from Invitrogen (Eugene, OR, Carlsbad, CA, US) and quantified using the Bio-Rad protein assay solution (Life Science Research, Hercules, CA, US). Western blotting was performed as previously described (Nestal de Moraes et al. 2014). Antibodies for procaspase-7 and -9 were purchased from R&D Systems (1:1000 dilution; Minneapolis, MN, USA), p53 from Dako cytomation Denmark A/S (1:500 dilution), procaspase-3, from BD Biosciences (1:1000 dilution; San Jose, CA, USA), and p21 from Cell Signaling (1:1000 dilution; Danvers, MA, USA). β -actin primary and mouse and rabbit secondary antibodies were purchased from Sigma-Aldrich (1:5000, 1:160,000 and 1:120,000 dilution, respectively; St Louis, MO, USA). HSC70 (1:500 dilution; Santa Cruz, CA, US) and β -actin were used as loading controls. Caspase activation was estimated by reduction of procaspase-3, -7 and -9 levels.

P-glycoprotein (Pgp) expression by flow cytometry

To compare Pgp membrane expression in MCF-7 and MCF-7 Dox^R cell lines, a total of 5×10^5 cells were stained

with anti-Pgp antibody (clone UIC2, Coulter, USA) and analyzed through flow cytometry as previously described by our group (Vasconcelos et al. 2011).

Statistical analysis

Statistical analysis of data was conducted using the GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). The paired Student's *t* test was used to compare differences between means from two groups.

Results

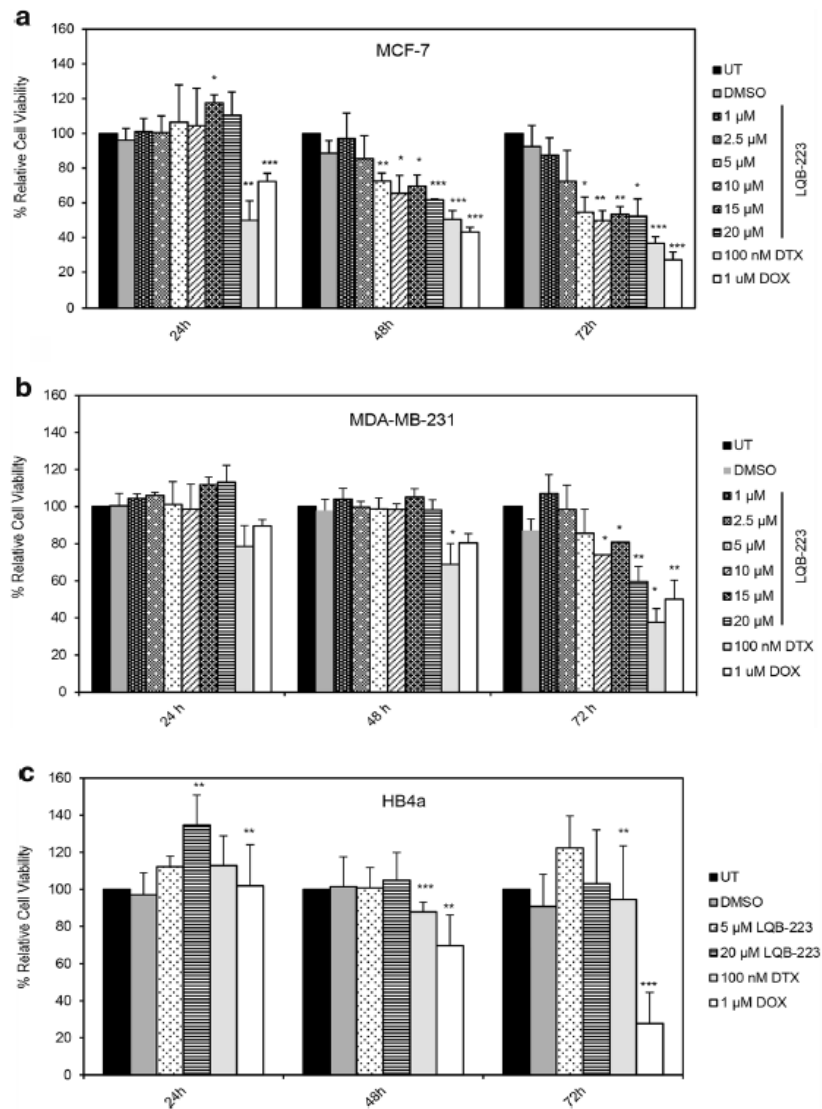
LQB-223 compound presents antitumour effects toward breast cancer cells and is less cytotoxic to non-neoplastic breast cells than docetaxel and doxorubicin

First, we evaluated whether LQB-223 compound could promote changes in cell viability in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. We observed that the treatment of MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines with LQB-223 resulted in decreased cell viability in a time-dependent manner (Fig. 1a, b and Online Resource 3 Tables 1 and 2). In MCF-7 cell line, there was a significant decrease in cell viability with 5 μM at 48 h incubation (Fig. 1a and Online Resource 3 Table 1). In MDA-MB-231 cells, the cell viability decrease at 20 μM LQB-223 was the most significant (Fig. 1b and Online Resource 3 Table 2). Besides, we observed morphological alterations when MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with LQB-223 for 48 h (Online Resource 1a–b), reinforcing the cytotoxic properties of LQB-223.

It has been widely shown that DTX and DOX treatment causes side effects to cancer patients, particularly because these drugs are cytotoxic not only to tumor cells, but also to normal tissues. Therefore, we tested whether LQB-223 compound would present lower cytotoxic to HB4a non-neoplastic breast cells compared to DTX and DOX. We did not observe any inhibition in cell viability after LQB-223 treatment, while DOX and DTX displaced significant cytotoxicity (Fig. 1c and Online Resource 3 Table 3). In addition, we could not observe pronounced morphological changes when HB4a cells were treated with LQB-223 for 48 h (Online Resource 2).

Then, we evaluated cell proliferation and LQB-223 compound reduced colony formation in both breast cancer cell lines, demonstrating its ability to inhibit cell proliferation (Fig. 2a, b). Although LQB-223 effect on proliferation was lower than DOX and DTX, there was a 50 % inhibition in colony formation. These results indicate that treatment with LQB-223 can efficiently reduce the viability

Fig. 1 LQB-223 compound presents antitumour effects toward breast cancer cells with little effect in breast non-neoplastic cell. **a** MCF-7, **b** MDA-MB-231 and **c** HB4a cell lines were treated with the LQB-223 compound for 24, 48 and 72 h and changes in cell viability were analyzed by the MTT assay. *UT* Untreated cells, *DMSO* Dimethyl sulfoxide, *DTX* Docetaxel, *DOX* Doxorubicin. Statistical significance was analyzed by the Student's *t* test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

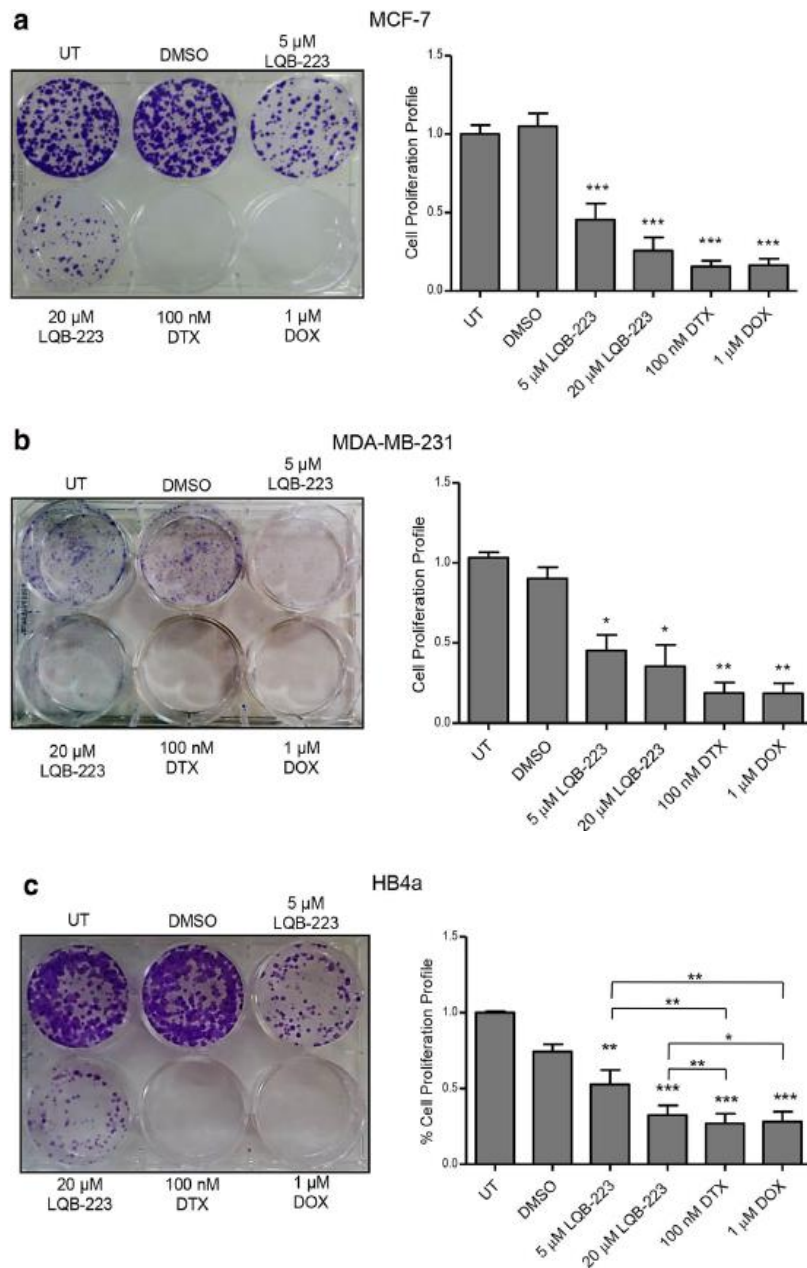


and proliferation of breast cancer cells. We have also observed a decrease in cell proliferation in non-neoplastic breast cells (Fig. 2c). Nevertheless, the decrease induced by LQB-223 was significantly less important to non-neoplastic breast cells than the decrease induced by treatment with the drugs conventionally used in the clinic scenario such as DTX and DOX ($p < 0.001$). These results suggest that LQB-223 induces low toxicity to non-neoplastic breast cells when compared to drugs currently used to treat breast cancer.

LQB-223 induces G2/M arrest to inhibit proliferation in breast cancer cells

Since our results showed that LQB-223 inhibited cell proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, we wondered if the compound could change the cell cycle profile. We found that there was a pronounced increase in the percentage of cells in G2/M phase at all time points and in both cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231 (Fig. 3a, b). Interestingly, this effect was comparable to the one

Fig. 2 Colony formation following LQB-223 treatment was assessed by the clonogenic assay. **a** MCF-7, **b** MDA-MB-231 and **c** HB4a were treated with LQB-223, DTX and DOX for 24 h, after which the drug was removed. After colony formation, cells were stained with crystal violet. Colonies were dissolved and optical density was measured. The graphs represent the mean \pm standard deviation from three independent experiments. *UT* Untreated cells, *DMSO* Dimethyl sulfoxide, *DTX* Docetaxel, *DOX* Doxorubicin. Statistical significance was analyzed by the Student's *t* test (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001)



observed after 100 nM DTX exposure. Also, we observed that there was an increase in the sub-G0/G1 population over time, especially in MCF-7 cells, suggesting induction of cell death by the compound. Similarly, to DOX and DTX treatment of MDA-MB-231 cell line, we found that LQB-223 exposure led to an increased number of hyperdiploid cells (Fig. 3b). These data indicate that LQB-223

might inhibit cell proliferation through impairing cell cycle progression.

LQB-223 compound acts irrespective of p53 status

In order to elucidate the mechanisms involved in G2/M cell cycle arrest caused by LQB-223 treatment, we

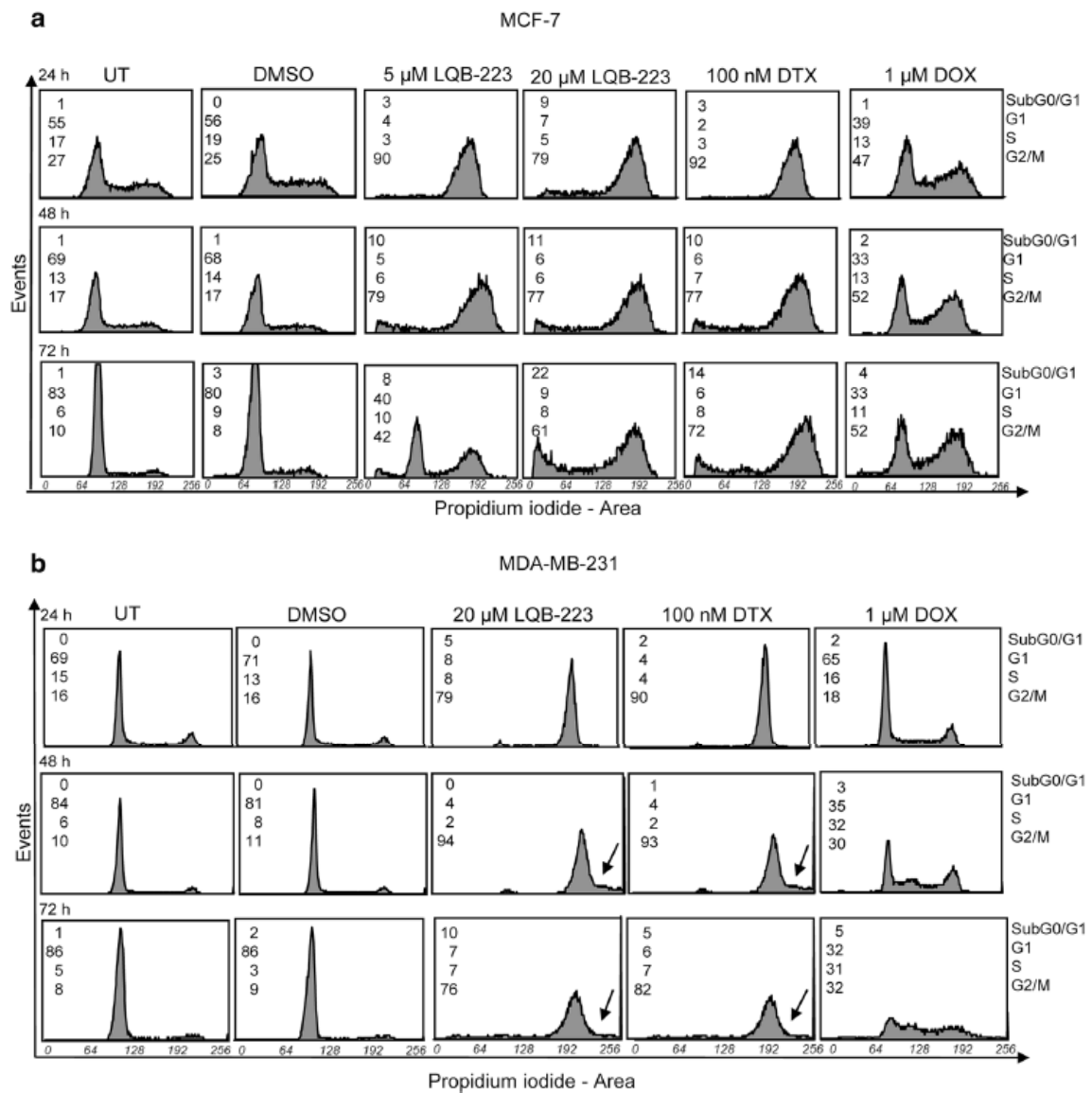


Fig. 3 LQB-223 induces G2/M arrest to inhibit proliferation in breast cancer cells. The MCF-7 (a) and MDA-MB-231 (b) cell lines were exposed to LQB-223 for 24, 48 and 72 h and the DNA content was analyzed by flow cytometry. *Arrows* indicate the population of

hyperdiploid cells. The histograms are representative of three independent experiments. The values represent the percentage of cells in each phase

investigated the expression levels of p53 and p21 proteins. The p21^{Cip1} protein is regulated by p53 in response to DNA damage (Ho et al. 2015). These proteins are important negative cell cycle regulators and influence the formation of cyclin/CDK complexes, which are essential for cell cycle progression (el-Deiry et al. 1993; Prives 1993;

Xiong et al. 1993). MCF-7 cell line showed increased p53 and p21^{Cip1} protein expression when cells were treated with 5 and 20 μM of LQB-223 at 48 h, suggesting that the compound can activate p53 expression in breast cancer cells presenting its wild-type functional form. Since p53 protein is quickly degraded, its activation status is reversed

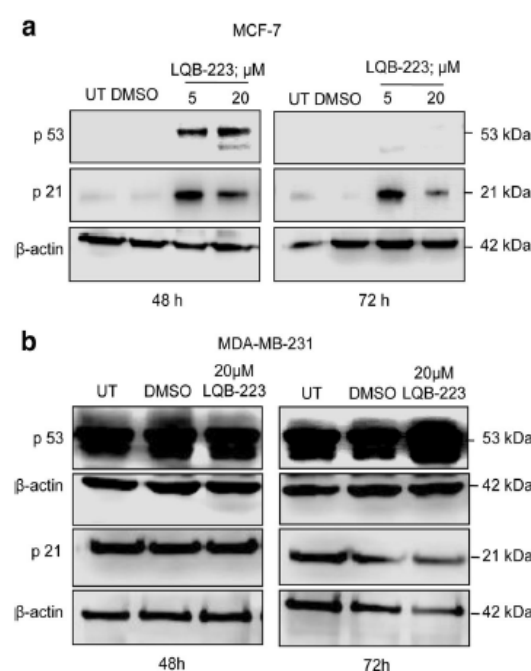


Fig. 4 LQB-223 compound acts independently of p53 status. **a** MCF-7 and **b** MDA-MB-231 cell lines were exposed to LQB-223 for 48 and 72 h. The levels of p21, p53 and β -actin (loading control) were analyzed by Western blotting. *UT* Untreated cells, *DMSO* Dimethyl sulfoxide

at 72 h (Fig. 4a). In MDA-MB-231 cell line, which presents the mutant form of p53, there was no modulation in p53 expression, not even in the levels of p21, its transcriptional target (Fig. 4b). These data show that LQB-223 can inhibit proliferation in breast cancer cells regardless of the p53 status.

The antineoplastic activity of LQB-223 on breast cancer cells also relies on its ability to induce apoptotic cell death

After establishing that LQB-223 induces G2/M cell cycle arrest and acts by p53 independent mechanisms, the next step was to investigate if the compound could induce apoptosis in breast cancer cells. We observed that LQB-223 treatment induced an increase in the percentage of Annexin V positivity in MCF-7 and MDA-MB-231 cells (Fig. 5a, b). To confirm this finding, we analyzed procaspases levels and found that there was a decrease of procaspases - and -9 levels in MCF-7 (Fig. 5c) and -3 and -7 in MDA-MB-231 cells (Fig. 5d) after 72 h of LQB-223 treatment. Our findings suggest that LQB-223 induces its cytotoxic effects by triggering apoptotic cell death.

LQB-223 is effective toward P-glycoprotein overexpressing doxorubicin-resistant cells

To further analyze whether LQB-223 would be effective against drug-resistant tumors, we studied its effects in the MCF-7 Dox^R cell line, a doxorubicin-resistant model originally derived from MCF-7 cells (Millour et al. 2011). These cells were originally resistant to DOX, but also developed cross-resistance to DTX (Fig. 6a). Our results showed that LQB-223 inhibited cell viability in a dose and time-dependent manner (Fig. 6a and Online Resource 3 Table 4). Remarkably, the compound was more effective in suppressing cell viability in MCF-7 Dox^R than in its parental MCF-7 cell line (Fig. 6b). Furthermore, LQB-223 suppressed colony formation in MCF-7 Dox^R cells as evaluated by the clonogenic assay, while this effect was not observed following DOX and DTX treatment (Fig. 6c). These results indicate that LQB-223 is a potent compound toward drug-resistant breast cancer cells. It is important to highlight that MCF-7 Dox^R cells present high levels of Pgp expression (Fig. 6d), a drug transporter well known to be overexpressed in drug-resistant tumor cells and to be closely linked to the development of the resistance phenotype (Kim et al. 2015; Trock et al. 1997).

Discussion

Breast cancer is the most frequent and one of the highest mortality-related malignancies in women worldwide (www.who.int/en). One of the causes of high mortality rates is the resistance to chemotherapy shown by many patients (Holan et al. 2013) and has been demonstrated in vitro since the 90s by Chen et al. (1990). Different mechanisms are involved in resistance to anthracyclines and taxanes. An important common mechanism to both treatments is the increased expression of Pgp, a drug efflux pump related to cross-resistance (Chintamani et al. 2005; Trock et al. 1997). Beyond that, treatment with chemotherapeutics has high toxicity for patients, therefore reducing their quality of life (Panis et al. 2012; Smith et al. 2010).

In order to improve the efficacy of patients' treatment with more effective and less toxic drugs, it is of great relevance to study the effect of new antineoplastic compounds. In our laboratory, many compounds, such as LQB-118, have been synthesized by Netto et al. (2010) and displayed potent activity against leukemia (de Faria et al. 2015; de Souza Reis et al. 2013; Maia et al. 2011; Nestal de Moraes et al. 2014), and prostate cancer cells displaying a resistant phenotype (Martino et al. 2014). However, when LQB-118 compound was tested in breast cancer cells, no viability change was observed (data not shown). Despite this, other pterocarpan-based compounds presented antineoplastic

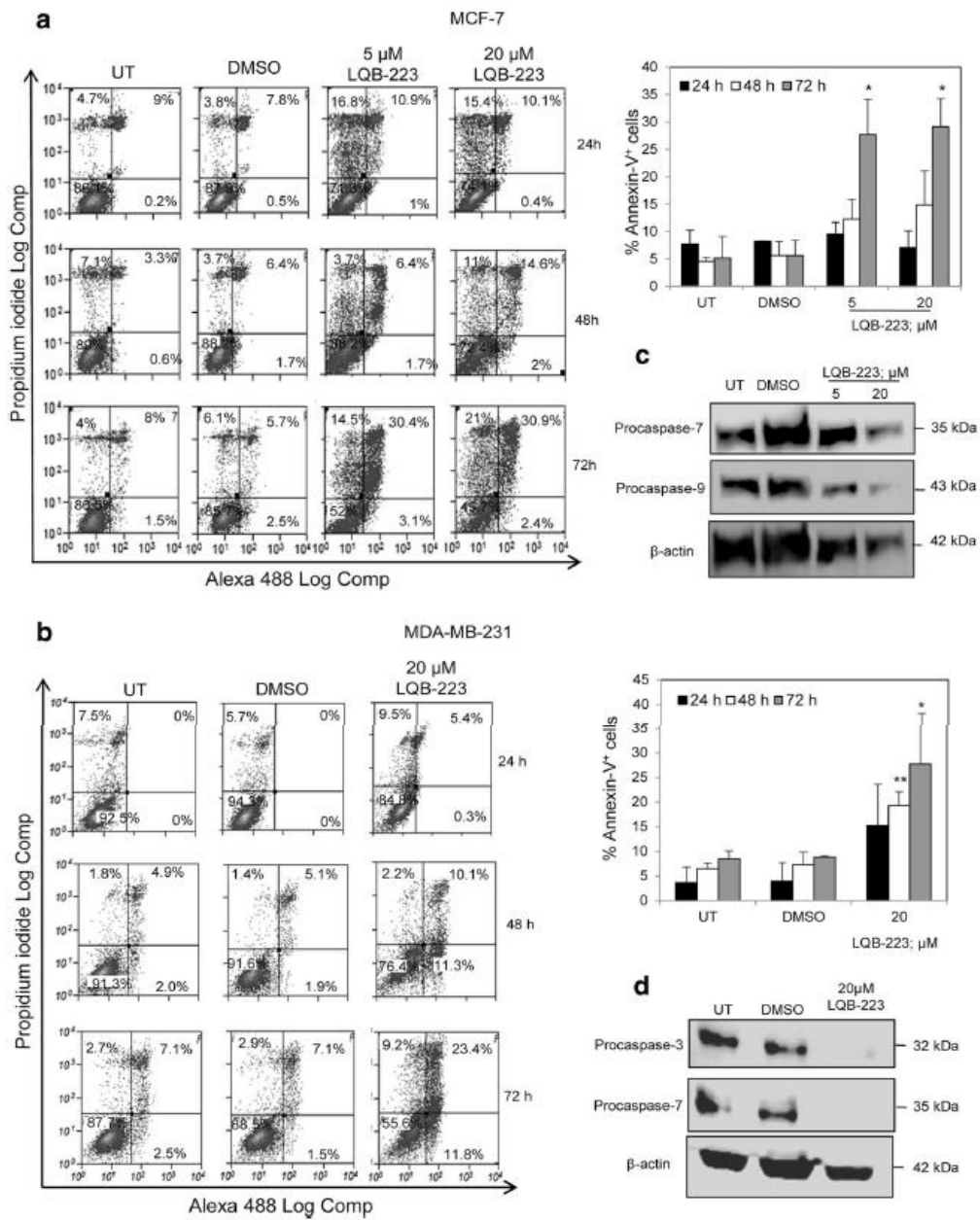


Fig. 5 Antineoplastic activity of LQB-223 on breast cancer cells also relies on its ability to induce apoptotic cell death. **a** MCF-7 and **b** MDA-MB-231 were treated with LQB-223 for 24, 48 and 72 h and analyzed for annexin V/PI staining by flow cytometry. **c** and **d** alternatively, the cell lines were exposed to LQB-223 for 72 h and

procaspase levels were evaluated by Western blotting. The graphs represent the mean \pm standard deviation from three independent experiments. *UT* Untreated cells, *DMSO* Dimethyl sulfoxide. Statistical significance was analyzed by the Student's *t* test (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001)

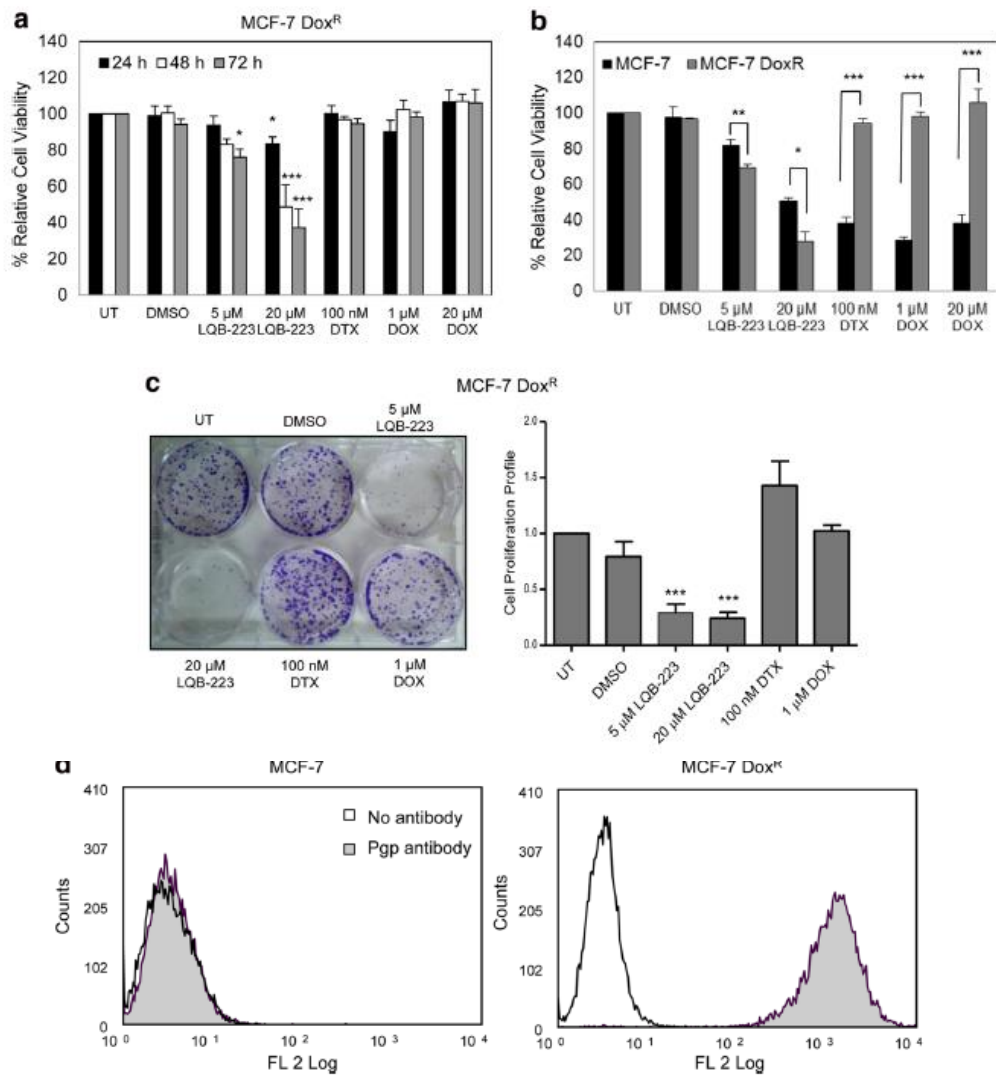


Fig. 6 LQB-223 can sensitize doxorubicin-resistant cells and overcome resistance. **a** MCF-7 Dox^R cells were treated with the LQB-223 compound for 24, 48 and 72 h and changes in cell viability were analyzed by the MTT assay. **b** MCF-7 Dox^R and MCF-7 cells were treated with LQB-223 compound for 72 h and changes in cell viability were analyzed by MTT assay. **c** MCF-7 Dox^R cells were treated with LQB-223, DOX and DTX for 24 h, after which the drug was removed. After colony formation, cells were stained with crystal

violet. Colonies were dissolved, and optical density was measured. **d** MCF-7 Dox^R and MCF-7 cells had Pgp (P-glycoprotein) expression analyzed by flow cytometry. The histograms are representative of three independent experiments. *UT* Untreated cells, *DMSO* Dimethyl sulfoxide, *DTX* Docetaxel, *DOX* Doxorubicin. Statistical significance was analyzed by the Student's *t* test (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001)

effects on leukemic cell lines, colon cancer, glioblastoma and melanoma (Buarque et al. 2011). Recently, the LQB-223 was designed by molecular hybridization from LQB-118 (Buarque et al. 2013). This compound was synthesized and demonstrated cytotoxicity regardless of the resistance phenotype in leukemia cells (Buarque et al. 2014).

Here, we observed that the LQB-223 compound reduced cell viability and proliferation of neoplastic breast cell lines with different resistance/sensitivity phenotypes. The compound was also selective for tumor cell lines, as it did not decrease cell viability in human breast non-neoplastic cell line, HB4a. Moreover, in the clonogenic assay, DTX

and DOX reduced cell proliferation more significantly than LQB-223 in the HB4a cells. Buarque and colleagues (Buarque et al. 2014) also demonstrated the selectivity of LQB-223 as it had cytotoxic effects to leukemia cells and no toxicity to ex vivo cultured lymphocytes derived from mice's spleen.

The clonogenic assay results prompted us to analyze the cell cycle profile and significant arrest in G2/M cell cycle phase was observed when MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with LQB-223. MCF-7 cells have a doubling time of 36 h, while MDA-MB-231 and MCF-7 Dox^R cells duplicate in 48 h. Comparing only MCF-7 and MDA-MB-231 cells, we could suppose that LQB-223 cytotoxic effects are more pronounced in MCF-7 due to its shorter duplication time (and thus, higher proliferative rates), which would make them more susceptible to a cytotoxic compound. However, our results demonstrated that LQB-223 showed more cytotoxicity toward dox-resistant MCF-7 Dox^R than MCF-7 and MDA-MB-231 cells, which suggest that the effects of LQB-223 on breast cancer cells do not depend only on their doubling time. In addition, we extended our cell cycle experiments to 72 h, so that all cell lines could be assessed for DNA content at least after one round of duplication. In accordance with our results, Buarque and colleagues (Buarque et al. 2014) observed cell cycle arrest and hyperdiploidy induced by LQB-223 in leukemia cell lines. It is well known that cell cycle is regulated by cyclin-CDK complexes (Sherr 1993; Weinberg 1995) and, specifically in the G2/M phase, modulation of cyclin B/CDK1 complex plays a major role. In this context, p21 binds to cyclin-CDK complexes (Xiong et al. 1993) and inhibits CDK kinase activity, playing an important role in the regulation of cell cycle checkpoints, including G2/M. p21 is regulated by p53 in response to DNA damage (el-Deiry et al. 1993; Ho et al. 2015; Prives 1993; Xiong et al. 1993). In this study, we observed the occurrence of cell cycle modulation in both cell lines, but p53 and p21 regulation after LQB-223 treatment was found only in MCF-7 cells harboring wild-type p53. This could be explained by the fact that MDA-MB-231 cells have functional p73 expression, which may partially assume p53 functions in p53-unfunctional cells (Vayssade et al. 2005; Wong et al. 2011). Overall, our results might suggest that LQB-223 cytotoxic effects do not depend upon p53 status, an observation quite important in the context of a disease with a high frequency of *TP53* gene mutations (Borresen-Dale 2003).

As a consequence of cell cycle arrest at G2/M, other cellular pathways can be activated, inducing apoptosis (Prives 1993; Zhou and Elledge 2000). Therefore, we demonstrated that LQB-223 induces apoptosis by detecting annexin V labeling and reduction in the procaspase-3, -7 and -9 levels. LQB-223 induces cytotoxic effects, reduces cell viability

and proliferation by mechanisms related to cell cycle arrest, ending in apoptotic cell death of breast cancer cells. The activation of apoptosis is a common mechanism among the chemotherapeutics studied, DTX and DOX (Ling et al. 1993; Shalli et al. 2005). However, many patients present chemotherapy resistance, which are eventually closely linked to reduced apoptotic indexes. An important mechanism involved in the resistance to DTX is alterations in β -tubulin isotypes expression (Greenberger et al. 1987; Shalli et al. 2005) and to DOX is topoisomerase II alterations and p53 mutations (Chernov and Stark 1997; Knappskog et al. 2015; Larsen and Skladanowski 1998). Because it is not likely that the LQB-223 cytotoxic compound acts the same way as DOX or DTX, it may represent a potential activator of apoptosis independently of these mechanisms of resistance.

Additionally, we observed viability and proliferation reduction in the resistant cell line, MCF-7 Dox^R, after LQB-223 treatment, which was remarkably more effective than DTX and DOX. Interestingly, the MCF-7 Dox^R cell line presents cross-resistance to DTX, a phenomenon commonly observed in patients who receive both drugs as treatment (Riordan and Ling 1985), providing an interesting model to study drug resistance. The cross-resistance and the multidrug resistance (MDR) are related to increased expression and activity of drug efflux pumps, most commonly Pgp (Chintamani et al. 2005; Gottesman et al. 2002; Volk et al. 2000; Zgurskaya and Nikaido 2000) and has been demonstrated in several cancer types (Liu et al. 2015; Turk et al. 2009; Vasconcelos et al. 2011). Many strategies have been developed to target Pgp, leading to drug accumulation inside the cell (Kumler et al. 2015; Turk et al. 2009). In breast cancer cells, the blockage of Pgp expression conferred more susceptibility to drugs (Linn et al. 1997; Yu et al. 1991). In order to understand cross-resistance in MCF-7 Dox^R cells, we measured the expression of Pgp and demonstrated that these cells exhibited high levels of the efflux pump. This result points out Pgp as an important factor involved in cross-resistance, corroborating the high cellular viability and proliferation observed when MCF-7 Dox^R cells were treated with DTX and DOX. Interestingly, it was observed MCF-7 Dox^R cells hypersensitivity to LQB-223 which suggests collateral sensitivity. Tumor cells expressing Pgp exhibits increased susceptibility to drug compared to parental cell line (Szakacs et al. 2014).

Our findings indicate that LQB-223 compound inhibits cell viability, promotes caspase-mediated apoptosis and induces G2/M arrest in breast cancer cell lines derived from different subtypes, irrespective of p53 status. Furthermore, the compound leads to decreased viability and proliferation in resistant breast cancer cell lines. This study provides insights into the mechanisms by which LQB-223 selectively targets cancer cells and points it as

a promising compound against breast neoplastic cells, particularly in tumors bearing the multidrug resistance phenotype.

Acknowledgments This work was supported by grants from Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Programa de Oncobiologia. We would also like to thank Matheus Andrade Rajão for technical support.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Azim HA Jr, de Azambuja E, Colozza M, Bines J, Piccart MJ (2011) Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Ann Oncol* 22:1939–1947. doi:10.1093/annonc/mdq683
- Bird BR, Swain SM (2008) Cardiac toxicity in breast cancer survivors: review of potential cardiac problems. *Clin Cancer Res* 14:14–24. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1033
- Borresen-Dale AL (2003) TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* 21:292–300. doi:10.1002/humu.10174
- Buarque CD et al (2011) Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. *Bioorganic Med Chem* 19:6885–6891. doi:10.1016/j.bmc.2011.09.025
- Buarque DS et al (2013) Differential expression profiles in the midgut of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE* 8:e61203. doi:10.1371/journal.pone.0061203
- Buarque CD, Salustiano EJ, Fraga KC, Alves BR, Costa PR (2014) 11a-N-Tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223), a promising prototype for targeting MDR leukemia cell lines. *Eur J Med Chem* 78:190–197. doi:10.1016/j.ejmech.2014.03.039
- Burnell M et al (2010) Cyclophosphamide, epirubicin, and Fluorouracil versus dose-dense epirubicin and cyclophosphamide followed by Paclitaxel versus Doxorubicin and cyclophosphamide followed by Paclitaxel in node-positive or high-risk node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 28:77–82. doi:10.1200/JCO.2009.22.1077
- Chargari C, Toillon RA, Macdermed D, Castadot P, Magne N (2009) Concurrent hormone and radiation therapy in patients with breast cancer: what is the rationale? *Lancet Oncol* 10:53–60. doi:10.1016/S1470-2045(08)70333-4
- Chen YN, Mickley LA, Schwartz AM, Acton EM, Hwang JL, Fojo AT (1990) Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein. *J Biol Chem* 265:10073–10080
- Chernov MV, Stark GR (1997) The p53 activation and apoptosis induced by DNA damage are reversibly inhibited by salicylate. *Oncogene* 14:2503–2510. doi:10.1038/sj.onc.1201104
- Chintamani, Singh JP, Mittal MK, Saxena S, Bansal A, Bhatia A, Kulshreshtha P (2005) Role of p-glycoprotein expression in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer—a prospective clinical study. *World J Surg Oncol* 3:61 doi:10.1186/1477-7819-3-61
- Curtis C et al (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486:346–352. doi:10.1038/nature10983
- de Faria FC, Leal ME, Bernardo PS, Costa PR, Maia RC (2015) NFκB pathway and microRNA-9 and -21 are involved in sensitivity to the pterocarpanquinone LQB-118 in different CML cell lines. *Anticancer Agents Med Chem* 15:345–352
- de Souza Reis FR et al (2013) The therapeutical potential of a novel pterocarpanquinone LQB-118 to target inhibitor of apoptosis proteins in acute myeloid leukemia cells. *Anticancer Agents Med Chem* 13:341–351
- el-Deiry WS et al (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817–825
- Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57:727–741
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2:48–58. doi:10.1038/nrc706
- Greenberger LM, Williams SS, Horwitz SB (1987) Biosynthesis of heterogeneous forms of multidrug resistance-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 262:13685–13689
- Hernandez-Vargas H, Palacios J, Moreno-Bueno G (2007) Molecular profiling of docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: uncoupling of aberrant mitosis and apoptosis. *Oncogene* 26:2902–2913. doi:10.1038/sj.onc.1210102
- Ho DH et al (2015) Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) phosphorylates p53 and induces p21(WAF1/CIP1) expression. *Mol. Brain* 8:54. doi:10.1186/s13041-015-0145-7
- Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG (2013) Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 13:714–726. doi:10.1038/nrc3599
- Kim CW, Asai D, Kang JH, Kishimura A, Mori T, Katayama Y (2015) Reversal of efflux of an anticancer drug in human drug-resistant breast cancer cells by inhibition of protein kinase Calpha (PKCalpha) activity. *Tumour Biol* doi:10.1007/s13277-015-3963-4
- Knappskog S et al (2015) Concomitant inactivation of the p53- and pRB- functional pathways predicts resistance to DNA damaging drugs in breast cancer in vivo. *Mol Oncol* 9:1553–1564. doi:10.1016/j.molonc.2015.04.008
- Kumler I, Stenvang J, Moreira J, Brunner N, Nielsen DL (2015) Drug transporters in breast cancer: response to anthracyclines and taxanes. *Expert Rev Anticancer Ther* 15:1075–1092. doi:10.1586/14737140.2015.1067610
- Larsen AK, Skladanowski A (1998) Cellular resistance to topoisomerase-targeted drugs: from drug uptake to cell death. *Biochim Biophys Acta* 1400:257–274
- Ling YH, Priebe W, Perez-Soler R (1993) Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells. *Cancer Res* 53:1845–1852
- Linn SC et al (1997) Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy. *Int J Cancer* 71:787–795
- Liu D et al (2015) Infection by Cx43 adenovirus increased chemotherapy sensitivity in human gastric cancer BGC-823 cells: not involving in induction of cell apoptosis. *Gene* 574:217–224. doi:10.1016/j.gene.2015.08.052
- Lyu YL, Lin CP, Azarova AM, Cai L, Wang JC, Liu LF (2006) Role of topoisomerase IIbeta in the expression of developmentally regulated genes. *Mol Cell Biol* 26:7929–7941. doi:10.1128/MCB.00617-06
- Maia RC et al (2011) LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. *Invest New Drugs* 29:1143–1155. doi:10.1007/s10637-010-9453-z

- Martino T, Magalhaes FC, Justo GA, Coelho MG, Netto CD, Costa PR, Sabino KC (2014) The pterocarpanquinone LQB-118 inhibits tumor cell proliferation by downregulation of c-Myc and cyclins D1 and B1 mRNA and upregulation of p21 cell cycle inhibitor expression. *Bioorganic Med Chem* 22:3115–3122. doi:10.1016/j.bmc.2014.04.025
- Millour J et al (2011) ATM and p53 regulate FOXM1 expression via E2F in breast cancer epirubicin treatment and resistance. *Mol Cancer Ther* 10:1046–1058. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0024
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
- Murray S, Briasoulis E, Linardou H, Bafaloukos D, Papadimitriou C (2012) Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat Rev* 38:890–903. doi:10.1016/j.ctrv.2012.02.011
- Nestal de Moraes G et al (2014) The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells of distinct molecular subtypes and targets FoxO3a and FoxM1 transcription factors. *Int J Oncol* 45:1949–1958. doi:10.3892/ijco.2014.2615
- Netto CD et al (2012) Immunological effects of taxol and TNF- α modulation in human PBMC cells. *Bioorganic Med Chem* 18:1610–1616. doi:10.1016/j.bmc.2009.12.073
- Panis C et al (2012) Immunological effects of taxol and adriamycin in breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 61:481–488. doi:10.1007/s00262-011-1117-0
- Perou CM et al (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747–752. doi:10.1038/35021093
- Prives C (1993) Doing the right thing: feedback control and p53. *Curr Opin Cell Biol* 5:214–218
- Riordan JR, Ling V (1985) Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance. *Pharmacol Ther* 28:51–75
- Shalli K, Brown I, Heys SD, Schofield AC (2005) Alterations of beta-tubulin isotypes in breast cancer cells resistant to docetaxel. *FASEB J* 19:1299–1301. doi:10.1096/fj.04-3178fje
- Sherr CJ (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73:1059–1065
- Smith LA, Cornelius VR, Plummer CJ, Levitt G, Verrill M, Canney P, Jones A (2010) Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Cancer* 10:337. doi:10.1186/1471-2407-10-337
- Stamps AC, Davies SC, Burman J, O'Hare MJ (1994) Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. *Int J Cancer* 57:865–874
- Swain SM, Whaley FS, Ewer MS (2003) Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer* 97:2869–2879. doi:10.1002/cncr.11407
- Szakacs G et al (2014) Targeting the Achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance. *Chem Rev* 114:5753–5774. doi:10.1021/cr4006236
- Trape AP, Katayama ML, Roela RA, Brentani H, Ravacci GR, de Araujo Lima L, Brentani MM (2012) Gene expression profile in response to doxorubicin-rapamycin combined treatment of HER-2-overexpressing human mammary epithelial cell lines. *Mol Cancer Ther* 11:464–474. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0033
- Trock BJ, Leonessa F, Clarke R (1997) Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst* 89:917–931
- Turk D, Hall MD, Chu BF, Ludwig JA, Fales HM, Gottesman MM, Szakacs G (2009) Identification of compounds selectively killing multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res* 69:8293–8301. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2422
- Vasconcelos FC, Silva KL, Souza PS, Silva LF, Moellmann-Coelho A, Klumb CE, Maia RC (2011) Variation of MDR proteins expression and activity levels according to clinical status and evolution of CML patients. *Cytom B Clin Cytom* 80:158–166. doi:10.1002/cyto.b.20580
- Vayssade M, Haddada H, Faridoni-Laurens L, Tourpin S, Valent A, Benard J, Ahomadegbe JC (2005) P73 functionally replaces p53 in Adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells. *Int J Cancer* 116:860–869. doi:10.1002/ijc.21033
- Volk EL, Rohde K, Rhee M, McGuire JJ, Doyle LA, Ross DD, Schneider E (2000) Methotrexate cross-resistance in a mitoxantrone-selected multidrug-resistant MCF7 breast cancer cell line is attributable to enhanced energy-dependent drug efflux. *Cancer Res* 60:3514–3521
- Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323–330
- Wong SW et al (2011) Rapamycin synergizes cisplatin sensitivity in basal-like breast cancer cells through up-regulation of p73. *Breast Cancer Res Treat* 128:301–313. doi:10.1007/s10549-010-1055-0
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366:701–704. doi:10.1038/366701a0
- Yu G et al (1991) Transfection with protein kinase C α confers increased multidrug resistance to MCF-7 cells expressing P-glycoprotein. *Cancer Commun* 3:181–189
- Zgurskaya HI, Nikaido H (2000) Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol* 37:219–225
- Zhang S, Liu X, Bawa-Khalife T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET (2012) Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* 18:1639–1642. doi:10.1038/nm.2919
- Zhou BB, Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408:433–439. doi:10.1038/35044005